



T.C.  
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

KAZEİN HİDROLİZATLARININ İŞLEVSEL ÖZELLİKLERİ

LEYLA ÖMEROĞLU

Ekim 2018



T.C.  
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

KAZEİN HİDROLİZATLARININ İŞLEVSEL ÖZELLİKLERİ

LEYLA ÖMEROĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Metin YILDIRIM

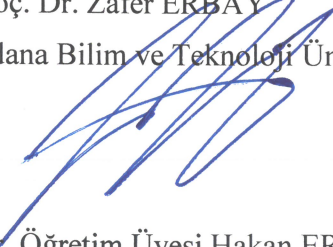
Ekim 2018

**Leyla ÖMEROĞLU** tarafından **Prof. Dr. Metin YILDIRIM** danışmanlığında hazırlanan “**Kazein Hidrolizatlarının İşlevsel Özellikleri**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :Prof. Dr. Metin YILDIRIM  
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye :Doç. Dr. Zafer ERBAY  
Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi



Üye :Dr. Öğretim Üyesi Hakan ERİNÇ  
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



**ONAY:**

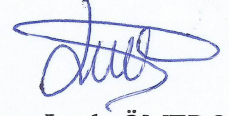
Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ....../...../2018 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun ....../...../2018 tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../2018

**Doç. Dr. Murat BARUT**  
**MÜDÜR V.**

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Leyla ÖMEROĞLU

## ÖZET

### KAZEİN HİDROLİZATLARININ İŞLEVSEL ÖZELLİKLERİ

ÖMEROĞLU, Leyla  
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Metin YILDIRIM

Ekim 2018, 61 sayfa

Bu çalışmanın amacı, tripsin (T) ve Neutrase (N) enzimleri yardımıyla farklı düzeylerde (%1, 5 ve 10) hidrolize edilen asit kazein (AK) hidrolizatları ile hazırlanan protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimlerine ait örneklerin işlevsel özelliklerini incelemektir. Bu amaçla, 6 farklı kazein hidrolizatı (1T, 5T, 10T, 1N, 5N ve 10N), 6 farklı protein-peptit etkileşimi (AK+1T, AK+5T, AK+10T, AK+1N, AK+5N ve AK+10N) ve 9 farklı peptit-peptit (1T+1N, 1T+5N, 1T+10N, 5T+1N, 5T+5N, 5T+10N, 10T+1N, 10T+5N, 10T+10N) hazırlanmıştır. Asit kazein ve hidrolize kazein örneklerinin (1T, 5T, 10T, 1N, 5N ve 10N) su, kül ve protein içerikleri sırasıyla %1,87-4,78, %1,54-5,41 ve %92,62-97,29 arasında değişim göstermiştir. Hidrolizatların ve protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimi ile hazırlanan örneklerin, asit kazeine oranla daha yüksek protein çözünürlüğüne sahip olduğu belirlenmiştir. İncelenen örneklerin yağ tutma kapasitesi 0,74-2,32 g yağ/g örnek arasında değişim göstermiştir. Protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimi sonucu hazırlanan örneklerin köpük kapasiteleri asit kazeine göre daha düşük çıkmıştır. Bütün örneklerin köpük stabiliteleri analiz süresine bağlı olarak önemli düzeyde azalma göstermiştir. Peptit-peptit etkileşimine ait örneklerin emülsiyon aktivite indeksleri genellikle kendilerini üretmek için kullanılan bileşenlerden daha düşük bulunmuştur. Protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimine ait örneklerin emülsiyon stabilite indeksleri ise düzensiz bir değişim göstermiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin işlevsel özellikler üzerinde etkili önemli faktörler olduğunu ortaya koymuştur.

*Anahtar Sözcükler:* Asit kazein, tripsin, Neutrase, hidroliz, işlevsel özellikler, protein-peptit etkileşimi, peptit-peptit etkileşimi

## SUMMARY

### FUNCTIONAL PROPERTIES OF CASEIN HYDROLYSATES

ÖMEROĞLU, Leyla

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor

: Professor Dr. Metin YILDIRIM

October 2018, 61 pages

The aim of this study was to investigate the functional properties of protein-peptide or peptide-peptide interactions formed with acid casein (AC) hydrolysates which were prepared by hydrolysing at different degrees (1, 5 and 10%) with proteolytic enzymes trypsin (T) or Neutrase (N). For this purpose, 6 different samples from acid casein hydrolysates (1T, 5T, 10T, 1N, 5N and 10N), 6 different samples representing protein-peptide interactions (AC+1T, AC+5T, AC+10T, AC+1N, AC+5N and AC+10N), and 9 different samples representing peptide-peptide interactions (1T+1N, 1T+5N, 1T+10N, 5T+1N, 5T+5N, 5T+10N, 10T+1N, 10T+5N and 10T+10N) were prepared. The moisture, ash and protein contents of acid casein and hydrolysed casein samples (1T, 5T, 10T, 1N, 5N and 10N) were 1.87-4.78%, 1.54-5.41% and 92.62-97.29%, respectively. Hydrolysates and the samples which were prepared with protein-peptide or peptide-peptide interactions had higher protein solubilities than acid casein. The oil holding capacity of the samples examined varied between 0.74-2.32 g oil/g sample. The foaming capacities of the samples prepared by protein-peptide or peptide-peptide interactions were lower than that of acid casein. The foam stability of all samples showed a significant decrease depending on the duration of the analysis. The emulsion activity indices of the samples belonging to peptide-peptide interactions were generally found to be lower than those of the components used to produce them. The emulsion stability indices of samples belonging to protein-peptide and peptide-peptide interactions changed irregularly. The data obtained in the study revealed that protein-peptide and peptide-peptide interactions are important factors affecting functional properties.

*Keywords:* Acid casein, trypsin, Neutrase, hydrolysis, functional properties, protein-peptide interactions, peptide-peptide interactions

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren, araştırmamın gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde büyük katkı sağlayan, titiz çalışma ve eğitim anlayışıyla beni akademik kariyer yolculuğuna yönlendiren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Metin YILDIRIM'a,

Yüksek lisans süresince tanıdığı fırsatlarla bana akademik bakış açısı kazandıran ve her konuda destek veren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM'a

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimini esirgemeyen sayın bölüm hocalarıma,

Her zaman beraber çalışmaktan keyif aldığım, tam bir ekip ruhuyla yüksek lisansım süresince hiçbir desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve yol gösteren, motivasyon sağlayan sevgili hocalarım ve arkadaşlarım Arş. Gör. Tuba SAKİN, Dr. Öğr. Üyesi Ezgi Demir ÖZER, Arş. Gör. Betül OSKAYBAŞ'a

Son olarak her kararında destekleri ve sabırları ile hep yanımda olan, bugünlere gelmemi sağlayan başta annem Hanım ÖMEROĞLU ve babam İsmet ÖMEROĞLU olmak üzere canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
ÖNSÖZ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
BÖLÜM I .....	1
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM II .....	3
KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	3
2.1 İşlevsel Özellikler .....	3
2.2 Kazein ve Özellikleri .....	5
2.3 Kazein Hidrolizi .....	8
2.4 Peptit-Peptit ve Peptit-Protein Etkileşimi .....	12
BÖLÜM III .....	14
MATERYAL VE METOT .....	14
3.1 Materyal .....	14
3.2 Metot .....	14
3.2.1 Kazein üretimi .....	14
3.2.2 Kazein hidrolizasyonu .....	15
3.2.3 Kazein hidrolizasyon düzeyinin belirlenmesi .....	16
3.2.4 Kurumadde analizi .....	16
3.2.5 Protein analizi .....	17
3.2.6 Kül analizi .....	17
3.2.7 Trisin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi .....	19

3.2.8 Protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin oluşturulması.....	20
3.2.9 İşlevsel özelliklerin belirlenmesi.....	20
3.2.9.1 Protein çözünürlüğünün belirlenmesi .....	20
3.2.9.2 Su ve yağ tutma kapasitesinin belirlenmesi.....	21
3.2.9.3 Köpük kapasitesi ve stabilitesinin belirlenmesi.....	22
3.2.9.4 Emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksinin belirlenmesi .....	23
3.2.9.5 İstatistiksel analiz.....	24
<b>BÖLÜM IV .....</b>	<b>25</b>
<b>BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>25</b>
4.1 Protein Hidrolizi.....	25
4.2 Asit Kazein ve Hidrolizatların Bileşimi .....	25
4.3 Trisin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Trisin-SDS-PAGE) .....	26
4.4 Asit Kazein ve Hidrolizatların Fonksiyonel Özellikleri .....	28
4.4.1 Protein çözünürlüğü .....	28
4.4.2 Su tutma kapasitesi .....	31
4.4.3 Yağ tutma kapasitesi.....	32
4.4.4 Köpük kapasitesi .....	35
4.4.5 Köpük stabilitesi.....	39
4.4.6 Emülsiyon aktivite indeksi.....	42
4.4.7 Emülsiyon stabilite indeksi .....	47
<b>BÖLÜM V .....</b>	<b>51</b>
<b>SONUÇLAR .....</b>	<b>51</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>54</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>63</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Trisin-SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltiler ve jel kompozisyonu.....	19
Çizelge 3.2. Deneme örneklerinin bileşimi .....	21
Çizelge 4.1. Asit kazein ve hidrolizatların su, kül ve protein içerikleri.....	26
Çizelge 4.2. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının protein çözünürlükleri (%) .....	29
Çizelge 4.3. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının yağ tutma kapasiteleri .....	32
Çizelge 4.4. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının köpük kapasiteleri.....	36
Çizelge 4.5. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının köpük stabilite (%) .....	40
Çizelge 4.6. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının emülsiyon aktivite indeksleri .....	43
Çizelge 4.7. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının emülsiyon stabilite indeksleri.....	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Asit kazein ve hidrolizatlara ait Trisin-SDS-PAGE elektroforetogramı .....	27
Şekil 4.2. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının yağ tutma kapasiteleri .....	33
Şekil 4.3. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının köpük kapasiteleri .....	37
Şekil 4.4. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının emülsiyon aktivite indeksleri .....	44
Şekil 4.5. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının emülsiyon stabilite indeksleri .....	49

# BÖLÜM I

## GİRİŞ

Tüketicinin bir gıda maddesinden beklediği işlevsel özellikler, gıdanın besleyici değeri dışında kalan diğer niteliklerinin tümüdür. Tüketici tercihlerini etkileyen işlevsel nitelikler kıvam, doku, tat-koku, renk ve görünüşdür (Singh vd., 2008; Ogunwolu vd., 2009).

Proteinler, tat-koku maddelerini taşıma, köpük, emülsiyon, jel ve hamur oluşturma gibi özellikleri ile gıdanın işlevsel niteliklerini belirleyen önemli bileşenler arasında yer alır (Fox ve Kelly, 2004). Gıda endüstrisinde çok önemli görevler üstlenen proteinlerin gıdalardaki işlevselliğini sahip oldukları nitelikler belirler (Darewicz vd., 2006). Proteinler, esansiyel aminoasit ve temel azot kaynağı olmaları nedeniyle beslenmede büyük bir öneme sahiptir (Hambraeus, 1992).

Gıda üretiminde kullanılan proteinler kabaca hayvansal (kazein, jelatin vb.) ve bitkisel (soya, yer fıstığı vb.) proteinler olmak üzere iki grupta toplanabilir (Fox ve Kelly, 2004). Hayvansal proteinler arasında, yeterli miktarda esansiyel aminoasit içermesi, yüksek sindirilebilirliğe ve işlevsel özelliklere sahip olması nedeniyle süt proteinleri öne çıkmaktadır (Hambraeus, 1992). Süt proteinleri, süt ürünlerinden içeceklere, diyet ve tıbbi gıdalara kadar birçok farklı üründe kullanılmaktadır (Mulvihill, 1992; Walstra vd., 1999; Van der Ven, 2002).

İnek sütü proteinlerinin yaklaşık %80'ini kazeinler, %20'sini ise serum proteinleri (peyniraltı suyu proteinleri) oluşturmaktadır. Kazeinler, izoelektrik noktaları olan pH 4,6'da çöktürülerek süttten ayrılabilirler.  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein olmak üzere dört gruba ayrılan kazeinler esnek, ısıya dayanıklı ve amfipatik (amfifilik) proteinlerdir (Mulvihill, 1992; Swaisgood, 1992). Fosfor içermeleri nedeniyle fosfoprotein olarak kabul edilen kazeinler sütte çapı 30-500 nm arasında değişen miseller halinde bulunur (Fox ve Kelly, 2004).

Proteinlerin işlevsel nitelikleri kimyasal veya enzimatik yöntemlerle iyileştirilebilir. Bu amaçla öncelikli olarak daha ılımlı şartlarda gerçekleştirilen enzimatik yöntemler tercih

edilmektedir (Haque ve Mozaffar, 1992). Proteolitik enzimler, besin değerinde herhangi bir kayıp oluşturmaksızın kontrollü şartlarda proteinlerin hidrolizini gerçekleştirerek fonksiyonel özelliklerin gelişmesini sağlayabilirler. Enzimatik hidroliz sonucunda proteinlerin molekül boyutu, hidrofobik ve hidrofilik özellikleri değişikliğe uğramaktadır. Proteinlerin hidrolizinde kullanılan enzim çeşidi ve işlem koşulları elde edilen hidrolizatın fonksiyonel özelliklerini ve gıdalardaki kullanım şeklini belirler (Panyam ve Kilara, 1996; Van der Ven vd., 2002).

Hidroliz sırasında oluşan protein-protein, protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimi hidroliz düzeyini etkileyebilmektedir (Amiot vd., 2004; Uluko vd., 2016). Ayrıca bu tür etkileşimler elde edilen hidrolizatın fonksiyonel nitelikleri üzerinde de belirleyici olabilmektedir. Protein-peptit veya peptit-peptit etkileşiminin agregasyona neden olabildiği belirlenmiştir (Creusot vd., 2006). Bu nedenle kazeinin farklı enzimlerle hidrolizi sonucunda elde edilen hidrolizatlarda da farklı düzeylerde protein-peptit veya peptit-peptit etkileşimleri gözlenebilir.

Hidroliz derecesi arttıka çözünebilirlik de artmaktadır (Gbogouri vd., 2004). Hidroliz derecesi ayrıca emülsiyon ve köpük oluşturma gibi diğer fonksiyonel nitelikleri de etkilemektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000; Gbogouri vd., 2004). Ancak yüksek hidroliz dereceleri fonksiyonel özellikleri çok olumsuz etkileyebilmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000).

Yapılan kaynak taramasında farklı enzimlerle hidrolize edilen kazein hidrolizat ve karışımlarındaki protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin fonksiyonel özellikler üzerindeki etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle asit kazeinden iki farklı proteolitik enzim ile üretilen hidrolizat ve karışımlarındaki protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin fonksiyonel özellikler üzerindeki etkisinin incelenmesi bu tez çalışmasının temel amacını oluşurmaktadır.

## BÖLÜM II

### KAYNAK ARAŞTIRMASI

#### 2.1 İşlevsel Özellikler

Emülsiyon oluşturma, köpürme ve jelleşme gibi işlevsel özellikleri ve besin değeri nedeniyle proteinler gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptir (Zayas, 1996). Proteinlerin işlevsel özellikleri, gıda işleme ve ürün geliştirme uygulamalarında büyük önem taşımaktadır. Su ve yağ tutma, emülsiyon, köpük ve jel oluşturma öne çıkan işlevsel özellikler arasında yer alır. Bu özelliklerden hangisinin daha önemli olduğu proteinin kullanıldığı gıda maddesine bağlı olarak değişim gösterir. Örneğin yüksek emülsiyon ve köpük oluşturma özellikleri çorbalar, salata sosları, şekerlemeler, donuk tatlı ve kek gibi gıdalarda öne çıkarken yüksek su ve yağ tutma kapasitesi ise sosis, ekmek ve kek gibi gıdalarda tercih edilen özelliklerdir (Kinsella, 1979; Ahmedna vd., 1999).

Emülsiyon, köpük ve jel oluşturma gibi işlevsel özellikleri çok önemli düzeyde etkilediğinden proteinlerin farklı ortamlardaki çözünürlükleri en önemli işlevsel niteliklerden birisidir (Kinsella, 1981). Protein-protein etkileşiminin en yüksek seviyede gerçekleşmesi nedeniyle genellikle en düşük protein çözünürlüğü izoelektrik noktada (pI) gözlenir. Tepkime ortamında bulunan iyonların konsantrasyonu ve çeşidi proteinlerin su tutma kapasitesini, şişmesini ve çözünürlüğünü önemli derecede etkilemektedir. Su molekülleri, yüklü gruplara (iyon-dipol etkileşimi), peptit bağlarına, asparajin ve glutaminin amid gruplarına, serin, treonin ve tirozinin hidroksil gruplarına (dipol-dipol etkileşimi) ve polar olmayan aminoasitlere bağlanabilmektedir (Cheftel vd., 1985; Saldamlı ve Temiz, 1998).

Proteinlerin su ile etkileşimi, gıdaların hem dokusunu hem de tat ve kokusunu şekillendirmesi açısından gıda sistemleri için çok önemlidir. Proteinlerin su tutma kapasitesini belirleyen iç faktörler aminoasit dizilimi ve bileşimi, üç boyutlu yapı ve yüzeyin hidrofobik/hidrofilik oranıdır. Ayrıca gıda işleme metotları gibi dış faktörlerin de proteinlerin su tutma kapasitesi üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır (Barbut, 1999). Su

tutma kapasitesi çorba ve fırıncılık ürünleri gibi viskozitesi yüksek gıda maddeleri için kritik bir işlevsel özelliktir. Bu ürünlerde proteinlerin çözünmeksizin suyu tutmaları ve bu sırada da viskoziteyi arttırıp kıvam ve yapı kazandırmaları gerekmektedir (Seena ve Sridhar, 2005). Enzimatik hidroliz sonucunda polar aminoasitler ile iyonlaşabilir grupların açığa çıkması su tutma kapasitesini arttırmaktadır (Vioque vd., 2000). Ancak hidrolizasyon derecesi arttıkça suda çözünür duruma gelen peptitlerin analiz sırasında uygulanan santrifüj ile ortamdan uzaklaşması nedeniyle bu peptitlerin su tutma kapasitesine katkısı olamamakta, tersine santrifüj işlemi sonrası uzaklaşan bu peptitler, örnek kaybı sebebiyle su tutma kapasitesinin azalmasına yol açabilmektedir (Guan vd., 2007).

Protein-yağ etkileşimi, gıdaların tat ve kokusu ile yapısını belirlemesi nedeniyle gıda sistemlerinde çok önemlidir (Barbut, 1999). Gıda emülsiyonları termodinamik açıdan kararlı olmayan su-yağ karışımlarıdır. Emülsiyon oluşması ve kararlılığı mayonez gibi gıda sistemlerinde çok önemlidir. Proteinler yüklü, yüksüz, polar ve apolar aminoasitleri kümeler oluşturacak şekilde içerebilmektedir. Bu aminoasit kümeleri proteinlere, hidrofilik ve hidrofobik özellikleri bir arada içeren yüzey aktif madde niteliği kazandırabilmektedir. Bu nedenle gıda sistemlerindeki proteinler hem yağ hem de su fazı ile etkileşime girebilmektedir. Proteinler tarafından oluşturulan emülsiyonların kararlılığını pH, iyonik güç, sıcaklık, karbonhidratların ve düşük molekül ağırlığına sahip yüzey aktif maddelerin varlığı, yağın ve proteinin tipi gibi faktörler de etkilemektedir. Bunların yanı sıra, emülsiyon oluşturma özelliğini proteinin çözünürlüğü de oldukça fazla düzeyde etkileyebilmektedir. Ancak bu iki özellik arasında tam bir doğrusal ilişki de bulunmamaktadır (Saldamlı ve Temiz, 1998). Çözünürlüğü düşük ve hidrofobik özelliği yüksek olan proteinlerin önemli ölçüde lipid bağlayabildikleri tespit edilmiştir. Küçük partikül boyutlu, düşük yoğunluklu proteinler yüksek yoğunluklu proteinlere göre daha fazla yağ tutma kapasitesine sahiptir (Cheftel vd., 1985). Wang ve Kinsella (1976), kütle yoğunluğu ile yağ emilimi arasındaki korelasyonun 0,95'in üzerinde olduğunu bildirmiştir.

Yağ tutma kapasitesinin yüksek olması, protein molekülü üzerindeki hidrofobik grup sayısının çok olduğunu göstermektedir (Subagio, 2006; Kaur ve Singh, 2007). Protein hidrolizi yağ tutma kapasitesini hem pozitif hem negatif yönde etkileyebilmektedir. Enzimatik hidroliz sonucu apolar grupların açığa çıkmasıyla yağ tutma kapasitesi de

artmaktadır (Vioque vd., 2000). Yağın fiziksel olarak hapsedilmesinin yağ tutma kapasitesi üzerinde pozitif yönde etkili olduğu, ancak hidroliz sonucunda yağın fiziksel olarak hapsedilmesini sağlayan yüzeylerin azalması nedeniyle yağ tutma kapasitesinin de azaldığı belirtilmektedir (Guan vd., 2007).

Köpük, emülsiyona benzer bir şekilde oluşur. Köpük oluşumunda, su molekülleri apolar faz olan hava küreciklerinin etrafını ince bir film şeklinde sarmaktadır. Proteinlerin hem polar hem de apolar grupları bir arada içermesi teorik olarak onları iyi bir köpük oluşturan bileşen konumuna getirmektedir. Bu nitelikleri sayesinde proteinler su-hava ara yüzeyine tutunarak hava küreciklerinin birleşmesine engel olur. Proteinlerin köpürme özellikleri, çırpılmış krema, dondurma, kek gibi gıda maddeleri için önem taşımaktadır (Kinsella, 1979; Saldamlı ve Temiz, 1998). Bir protein molekülünün iyi bir köpürme özelliği gösterebilmesi için (i) hava-su ara yüzeyine hızlı bir şekilde taşınabilmesi, (ii) hızlı bir yapısal değişikliğe uğrayarak ara yüzeyde yeniden düzenlenebilmesi ve (iii) moleküller arası etkileşimler yoluyla viskoelastik bir film oluşturabilmesi önemlidir (Makri vd., 2005). Esnek ikincil ve üçüncül yapıya sahip moleküller köpüğün etkili bir şekilde oluşumu için gerekliken moleküller arası çekim ve yapısal elastikiyet kararlı bir köpük oluşumu için önemli bulunmaktadır (Kinsella, 1981; Damodaran, 1990). Hidrolizatların köpürme özelliği başlangıç proteininden önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Bir taraftan hidroliz, ara yüzeye daha hızlı taşınmayı sağlayan moleküller ağırlıkta azalmaya yol açarken (Wilde ve Clark, 1996) diğer taraftan da oluşan peptitler proteinlerin yerini alarak veya protein-protein etkileşimini bozarak köpüğün kararlılığını azaltır (Zhu ve Damodaran, 1994; Wilde ve Clark, 1996). Dahası hidroliz, köpük kararlılığını olumsuz etkileyen yük yoğunluğunun (elektrostatik itme) artmasına da yol açar (Lorient vd., 1989; Zhu ve Damodaran, 1994).

## **2.2 Kazein ve Özellikleri**

İnek sütündeki toplam proteinin %80'ini oluşturan kazeinin,  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein olmak üzere 4 çeşidi vardır (Capriotti vd., 2016). Süt proteinlerinin birincil yapıları ile birlikte üç boyutlu yapıları da aydınlatılmıştır. Kazeinleri kristalleştirmeye yönelik girişimlerin bugüne kadar başarısız olması nedeniyle bunların ikincil ve üçüncül yapıları tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Fox ve McSweeney, 2013).

Kazeinler sütte, yaklaşık 30-500 nm çapında misel olarak adlandırılan kompleks yapılar oluşturur. Kazeinin misel yapısını tanımlamak için çeşitli modeller ileri sürülmüştür. İlk öne sürülen sub-misel modelinde, belirli oranlarda  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein içeren sub-miseller kolloidal kalsiyum fosfat köprüleri ile birleşerek miselleri oluşturur.  $\kappa$ -kazeince zengin sub-miseller esas olarak misel yüzeyinde yer alır.  $\kappa$ -kazeinin hidrofilik C-terminal bölgesi, iplikli uzantılar şeklinde serum fazına yönelir ve sahip olduğu negatif yük ve Brownian hareketi nedeniyle ortaya çıkan sterik itme sayesinde miseli kararlı hale getirir (Walstra vd., 1999). Kazein miseli %40  $\alpha_{s1}$ -kazein, %10  $\alpha_{s2}$ -kazein, %35  $\beta$ -kazein ve %15 (m/m)  $\kappa$ -kazein içerir (Broyard ve Gaucheron, 2015).

Tek bir polipeptit zincirinden oluşan  $\kappa$ -kazeinin 10'dan fazla genetik varyantı bulunmaktadır. Bunlar arasında A ve B varyantları en çok görülmüştür. Bu varyantlar arasında sadece iki aminoasit farklılığı söz konusudur (A varyantında Asp 169/Thr 157 bulunurken B varyantında Ala 169/Ile 157 bulunur) (Farrell vd., 2004).  $\kappa$ -kazeinin birincil dizisi 169 aminoasit kalıntısı içerir. Kazeinler içerisinde  $\kappa$ -kazein, bazı benzersiz özellikler gösterir. Kazein miselinin en stabil bileşeni olan  $\kappa$ -kazein, galaktoz, N-acetilgalaktozamin ve/veya N-asetilnöraminik (sialik) asit içeren bir gliko-proteindir.  $\kappa$ -kazein, düşük fosforilasyon derecesi ve kalsiyum duyarlılığına sahip olup kazeinlerin en küçüğüdür. Diğer kazeinler gibi,  $\kappa$ -kazein de değişken fosforilasyon düzeyleri göstermektedir.  $\kappa$ -kazeinin monofosforilize formu sadece Ser<sub>149</sub>'dan, difosforilize formu ise Ser<sub>149</sub> ve Ser<sub>121</sub>'den fosforilize edilmiştir (Mercier, 1981; Minkiewicz vd., 1996; Talbo vd., 2001; Holland vd., 2006).  $\kappa$ -kazeinin (A varyantının) kütlesi teorik olarak yaklaşık 19 kDa'dır. Sentez sonrası fosforilasyon ve glikozilasyona bağlı olarak moleküler ağırlık değişiklik gösterebilmektedir. Aminoasit dizisi kullanılarak hesaplanan teorik izoelektrik nokta (pI) yaklaşık 5,93 olmakla birlikte, sentez sonrası fosforilasyon ve glikozilasyona bağlı olarak protein üzerinde artan negatif yükler  $\kappa$ -kazeinin izoelektrik noktasını pH 3,50 gibi değerlere kadar düşürebilmektedir (Holland vd., 2006).

Alfa-s-kazein, tipik bir fosfo-protein olup kalsiyuma karşı son derece duyarlı  $\alpha_{s1}$ - ve  $\alpha_{s2}$ -kazein formlarında bulunur.  $\alpha_{s1}$ -kazein, toplam kazein içinde miktar açısından en büyük orana sahip kazein fraksiyonudur (yaklaşık %40). Protein, 199 aminoasit kalıntısından oluşur. Fosforilize edilmiş proteindeki 16 serin aminoasidinin 8'i (Ser<sub>45</sub>, Ser<sub>47</sub>, Ser<sub>64</sub>, Ser<sub>66</sub>,

Ser<sub>67</sub>, Ser<sub>68</sub>, Ser<sub>75</sub> ve Ser<sub>115</sub>) fosforilize edilmiştir (Mercier vd., 1971). Aminoasit kompozisyonu dikkate alındığında sentez sonrası modifikasyondan önceki teorik kütlesi yaklaşık 23,0 kDa olarak hesaplanmıştır. Bu değerin 8 Ser aminoasidinin fosforilizasyonu sonucunda 23,6 kDa'a yükseldiği bildirilmiştir. Aminoasit dizisi dikkate alındığında  $\alpha_{s1}$ -kazeinin izoelektrik noktası 4,90 pH olması gerekirken 8 Ser aminoasidinin fosforilizasyonu sonucunda yaklaşık 0,50 pH birimi azalarak 4,40-4,80 pH değerine geriler (Trieu-Cuot ve Gripon, 1981; Eigel vd., 1984).  $\alpha_{s1}$ -kazeinde değişen düzeylerde ikincil yapı tespit edilmiştir. Örneğin  $\alpha$ -heliks (sarmal) için %5-15 (Herskovits, 1966), %8-13 (Byler vd., 1988), %20 (Creamer vd., 1981) ve %13-15 (Malin vd., 2005) gibi farklı oranlar bildirilmiştir.

Alfa-s<sub>2</sub>-kazeinin 207 aminoasit içerdiği, yaklaşık 24,3 kDa'luk kütlenin, 11 Ser kalıntısının fosforilizasyonu sonucunda 25,2 kDa'a yükseldiği belirtilmiştir. Sentez sonrası modifikasyondan önce yaklaşık 8,30 pH olarak hesaplanan izoelektrik noktanın fosforilizasyon sonucunda yaklaşık 4,90 pH'ya gerilediği tespit edilmiştir. 33 pozitif ve 39 negatif yük taşıma kapasitesine sahip olması nedeniyle,  $\alpha_{s2}$ -kazeinin en hidrofilik kazein olduğu kabul edilmektedir (Farrell vd., 2009). Serin aminoasidinin 10, 12, veya 13'ünün fosforilizasyona uğradığı  $\alpha_{s2}$ -kazein çeşitleri de bulunmaktadır (Brignon vd., 1976).  $\alpha_{s2}$ -kazeinin, molekül içi veya moleküller arası disülfid bağları oluşturabilen iki Cys kalıntısı (Cys<sub>36</sub> ve Cys<sub>40</sub>) içerdiği rapor edilmiştir.  $\alpha_{s2}$ -kazein genellikle disülfid bağlı dimerler halinde bulunur ve çözelti içindeki  $\alpha_{s2}$ -kazein plazmine karşı oldukça duyarlıdır; ancak sütte  $\alpha_{s2}$ -kazein kaynaklı peptidlere rastlanmamıştır (Fox, 2001).

İnek sütü kazeininin yaklaşık %35'ini oluşturan  $\beta$ -kazein, 209 aminoasit içeren tek bir polipeptit zincirinden ibarettir. Fosforilizasyon öncesi 23,6 kDa olan kütlesi, 5 Ser aminoasidinin fosforilizasyonu sonucunda 24,0 kDa'a yükselir. Fosforilizasyon öncesi yaklaşık 5,1 pH olan izoelektrik noktası, fosforilizasyon sonrası yaklaşık 4,7 pH değerine geriler. Bu değer deneysel olarak belirlenen 4,8-5,0 pH değerinden daha düşüktür (Trieu-Cuot ve Gripon, 1981). Yüksek bir amfipatik özellikteki  $\beta$ -kazeinin N-terminali, yani 1. ve 40. aminoasitler arasındaki bölgesi, esas olarak molekülün bütün net yükünü içerir ve düşük bir hidrofobisiteye sahiptir.  $\beta$ -kazeinin orta kısmı, yani 41. ve 135. aminoasitler

arasındaki bölgesi, az miktarda yük taşır ve orta derecede bir hidrofobisiteye sahiptir. C-terminali (136. ve 209. aminoasitler arasındaki bölge) ise az miktarda yük taşır ve apolar aminoasitlerin çoğunu içerdiğinden yüksek bir hidrofobisiteye sahiptir (De Kruif ve Holt, 2003).  $\beta$ -kazein, %10'luk  $\alpha$  heliks yapısı ile düşük ikincil yapıya sahip bir proteindir (Herskovits, 1966; Noelken ve Reibstein, 1968; Caessens vd., 1999).

Sütten kazeinin ayrılması için kullanılan yöntemlerin çoğunda, süt yağı uzaklaştırıldıktan sonra bir protein çöktürme işlemi uygulanmaktadır. Bu işlem çoğunlukla, ya izoelektrik (asit yardımıyla) ya da enzimatik (hayvansal, bitkisel veya mikrobiyal rennet yardımıyla) çöktürme şeklinde gerçekleştirilmektedir (El-Bakyr, 2012).

### **2.3 Kazein Hidrolizi**

Gıda proteinlerinin birden fazla işlevsel özelliği aynı anda göstermesi arzu edilir. Bununla birlikte, ticari gıda proteinlerinin çoğunluğu sınırlı sayıda işlevsel özelliğe sahiptir. Bu nedenle proteinlerin işlevsel özelliklerini geliştirmek amacıyla değişik fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemler uygulanmaktadır (Nielsen, 1997).

İlmlı koşullarda gerçekleşmesi, yüksek düzeyde özgünlük göstermesi, kolay kontrol edilebilir olması gibi faktörler enzimatik modifikasyonu öne çıkarmaktadır. Proteinlerin enzimatik modifikasyonu aminoasitlerin yan gruplarının düzenlenmesi, protein zincirlerinin çapraz bağlanması veya peptit bağının hidrolize edilmesi şeklinde uygulanabilmektedir. Bunlar arasında enzimatik hidroliz yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimatik hidroliz, asit veya alkali ile gerçekleştirilen hidrolizinden çok daha özgün, ılımlı ve kontrol edilebilir olma üstünlüğüne sahiptir. Uygun enzimlerin seçimi ile sadece belirli peptit bağlarının parçalanması sağlanabilmektedir. Proteinlerin enzimatik hidrolizi Adler-Nissen (1986) tarafından kapsamlı olarak incelenmiştir. Protein hidrolizinde önemli parametrelerden birisi hidroliz derecesidir (DH) ve hidrolize edilen peptit bağının toplam peptit bağına oranı şeklinde tanımlanır. DH genellikle, serbest aminoasit azotunun (AN) Kjeldahl yöntemi ile belirlenen toplam azota (TN) oranı (AN/TN) şeklinde ifade edilir. Hidrolizattaki aminoasit azotunun belirlenmesi için farklı yöntemler kullanılmakta olup sıkça uygulananlar arasında

o-fitaldialdehit (OPA), formol titrasyon ve 2,4,6-trinitrobenzenesülfonik asit (TNBS) yöntemleri yer almaktadır (Frister vd., 1988; Adler-Nissen, 1979).

Süt proteinlerinin enzimatik hidrolizi, gıda formülasyonlarında ihtiyaç duyulan işlevsel özelliklerin iyileştirilmesini mümkün kılar. Enzimatik hidroliz yoluyla işlevsel özellikleri iyileştirebilmek için doğru proteolitik enzimin (pepsin, tripsin, Neutrase, kimotripsin, plazmin gibi), hidroliz süresinin, çevresel koşulların ve hidroliz derecesinin seçimi önemlidir. Kontrollü hidroliz, bazı işlevsel özellikleri iyileştirebilirken diğerlerini olumsuz yönde etkileyebilir (Panyam ve Kilara, 1996). Yüzey hidrofobisitesi, köpük ve jel oluşturma, emülsiyon kapasitesi ve stabilitesi ile çözünürlük hidrolizden en fazla etkilenebilecek işlevsel özelliklerdir. Kısmi hidroliz işlevsel özellikleri geliştirebilirken aşırı hidroliz ise olumsuz yönde etkileyebilir. Ayrıca genellikle yüksek hidroliz derecelerinin acılığa neden olduğu da bilinmektedir. Kazeinler, esnek ve düşük ikincil yapı oranına sahip olmaları nedeniyle, kompakt globüler yapıdaki peyniraltı suyu proteinlerine oranla daha kolay hidrolize edilirler (Banach vd., 2013). Diğer proteinlerde tespit edildiği gibi kazeinin de sınırlı düzeyde hidrolizi işlevsel özelliklerin iyileşmesini sağlarken aşırı düzeyde hidrolizi işlevsel niteliklerin olumsuz yönde etkilenmesine yol açmaktadır (Mahmoud vd., 1992; Slattey ve FitzGerald, 1998).

Kazein, tripsin ile hidrolizasyon derecesi %4,3, 8,0 ve 9,9 olacak şekilde hidrolize edildiğinde 4-5 pH aralığındaki çözünürlüğünde artış gözlenmiştir. Ayrıca hidrolizatların izoelektrik noktadaki emülsiyon kapasiteleri de daha yüksek bulunmuştur. Hidrolizatların emülsiyon özelliklerini korumak için hidrolizatlarda 5000 Da'dan daha küçük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin bulunmaması gerektiği saptanmıştır (Chobert vd., 1988a).

*Staphylococcus aureus* V8 proteazı (proteine bağlı glutamik asidin karboksil ucuna özgü) ile kazein %2,0 ve 6,7 düzeyinde hidrolize edildiğinde, hidrolizatların emülsiyon aktivitelerinin bütün pH değerlerinde kazeine göre azaldığı saptanmıştır. Boyut ayırıcı kromatografi ile belirlendiği üzere %2'lik hidrolizasyon derecesine sahip hidrolizatların %70'inden, %6,7'lik hidrolizasyon derecesine sahip hidrolizatların ise %90'ından fazlasını 12400 Da'dan daha küçük molekül ağırlığındaki peptitler oluşturmuştur. Hidrolizatların 4,0-5,0 pH arasındaki

çözünürlüğü kazeinden çok daha yüksek (kazein, %2 ve %6,7 hidroliz düzeyine sahip örnekler için sırasıyla %0, %25 ve %50) bulunmuştur (Chobert vd.,1988b).

Haque ve Mozaffar (1992) asit kazeinin immobilize tripsin, kimotripsin ve Rhozyme-41 enzimleriyle hidrolize ederek işlevsel niteliklerini belirlemiştir. Asit kazeinin emülsifiye etme niteliğinin hidroliz sonucunda önemli ölçüde iyileştiği saptanmıştır. İmmobilize Rhozyme-41 ile hidrolizasyon, emülsiyon aktivitesinde 3,2 katlık bir artış sağlamıştır. En yüksek yağ tutma kapasitesi immobilize tripsin kullanıldığında elde edilmiştir. Hidrolizatların çözünebilirliği ve termal stabilitesi kontrol örneğine göre çok daha yüksek bulunmuştur.

Ticari bir *Bacillus* proteinaz kompleksi ile üretilen sodyum kazeinat hidrolizatlarının işlevsel ve fiziko-kimyasal özellikleri Slattery ve FitzGerald (1998) tarafından incelenmiştir. Düşük hidroliz derecelerine (%0,5 ve 1,0) sahip örnekler, hidrolize uğratılmamış örneğe göre pH 2 ve 4'te daha iyi emülsiyon aktivitesi göstermesine karşın yüksek hidroliz düzeylerine sahip örnekler tersine daha düşük emülsiyon aktivitesi göstermiştir. Ayrıca düşük hidroliz derecesine sahip örneklerin pH 8 ve 10'da daha yüksek köpük kapasitesi ve stabilitesine sahip oldukları da belirlenmiştir.

Kazein ve peyniraltı suyu proteinlerinin, 11 farklı ticari enzim (Pem, Flavourzyme, Alcalase, Promod 184, Promod 258, Pepsin, Protex 6L, NewlaseF, Corolase PP, Corolase L10 ve Validase FP) kullanılarak hidrolize edildiği çalışmada, kazein (hidrolizasyon derecesi %0,5-22,0) ve peyniraltı suyu proteinleri (hidrolizasyon derecesi %5,5-24,0) hidrolizatlarının emülsiyon ve köpük oluşturma özellikleri incelenmiştir. Bazı kazein hidrolizatlarının emülsiyon ve köpük oluşturma kapasitelerinin hidrolize edilmemiş kazeininkine benzer olduğu saptanmıştır. Emülsiyonun kararsızlığı krema tabakası oluşumu (yağ küreciklerinin yüzeyde birikmesi) ve koalesens (yağ küreciklerinin birleşmesi) sonucunda gerçekleşmiştir. Krema tabakası oluşumu büyük yağ küreciklerine sahip emülsiyonlarda, koalesens ise kürecik boyutunun geniş bir aralıkta değişim gösterdiği emülsiyonlarda gözlenmiştir. Fazla miktarda 2 kDa'dan büyük peptite sahip örneklerin daha kararlı emülsiyon oluşturdıkları saptanmıştır (Van der Ven vd., 2001).

Sodyum kazeinatın Protamex enzimi ile %2,7, 5,3 ve 13,3 düzeyinde hidrolize edildiği çalışmada, hidrolizatların pH 2,0-10,0 aralığında çözünebilirliği, emülsiyon ve köpük oluşturma özelliği ile viskozitesi incelenmiştir. Bütün pH değerlerinde, %13,3 hidroliz derecesine sahip örneğin köpürme kapasitesi ısıtılmış ve ısıtılmamış sodyum kazeinat örneklerine oranla daha yüksek bulunmuştur. Hidroliz işleminin izoelektrik nokta etrafındaki çözünürlüğü, alkali pH'daki emülsiyon aktivite ve stabilitesini ısıtılmamış kazeine göre önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Flanagan ve FitzGerald, 2002).

Crowley vd. (2002) tarafından Neutrase, Protamex, Alcalase, Flavourzyme ve PTN 3.0S ticari enzimleriyle sodyum kazeinat %1 düzeyinde hidrolize edilmiştir. Bütün hidrolizat örnekleri pH 2,0, 7,5 ve 10'da sodyum kazeinata oranla daha yüksek köpük kapasitesi sergilemişlerdir. En kararlı emülsiyon Alcalase ile hidrolize edilen kazein hidrolizatı kullanılarak pH 10,0 değerinde saptanmıştır. Hidrolizatlar arasında en yüksek su bağlama kapasitesine Neutrase ile hidrolize edilen hidrolizatların sahip olduğu belirlenmiştir. Sodyum kazeinatın (0,88 mL/g), hidrolizatlardan (0,76-0,87 mL/g) daha yüksek su bağlama kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur.

Sodyum kazeinat ve peyniraltı suyu proteinleri 11 farklı ticari enzim (Pem, Flavourzyme, Alcalase, Promod 184, Promod 258, Pepsin, Protex 6L, NewlaseF, Corolase PP, Corolase L10 ve Validase FP) ile hidrolize edilmiştir. Çalışmada, bütün kazein hidrolizatlarının yüksek köpük kapasitesi gösterdiği saptanmıştır. Köpük stabilitesi, kazein hidrolizatlarının çoğunluğunda sodyum kazeinata göre daha düşük bulunmuştur. Kazein hidrolizatlarının köpük stabilitesi moleküler ağırlık dağılımına paralellik göstermiş, 7 kDa'dan büyük peptitlerin oranının fazlalığı köpük stabilitesi ile doğrusal ilişki sergilemiştir (Van der Ven vd., 2002).

Pralea vd. (2011), sodyum kazeinatı kimotripsin ile farklı düzeylerde hidroliz edip (maksimum hidroliz derecesi %8,7) santrifüj işlemi sonrası sıvı fazı (pH 4,6'da çökmeyen kısım) donuk kuruttuktan sonra işlevsel özelliklerini incelemişlerdir. Farklı hidrolizasyon derecesine sahip örneklerin tamamı 2-8 pH aralığında %90'ın üzerinde çözünürlük sergilemiştir. Köpük kapasitesi hidrolize olmamış kazein ile 10 dakika hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatta benzer bulunmuştur. Hidroliz süresinin 40 dakikanın üzerine çıkmasıyla birlikte köpük kapasitesi hafifçe azalma göstermiştir. Hidrolize olmamış kazein örneği hidrolizatlara oranla daha yüksek bir köpük stabilitesi göstermiş, hidroliz süresi arttıkça

köpük stabilitesinin azaldığı saptanmıştır. Bu veriler, köpük kapasitesini arttırmak için sınırlı bir hidrolizin gerekli olduğunu ancak böyle bir durumda köpük stabilitesinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir.

Sodyum kazeinat, papain, pankreatin ve tripsin enzimleri ile 10 dakikadan 24 saate kadar değişen sürelerde hidrolize edilip hidrofobisite, antioksidan aktivite ve emülsiyon özellikleri incelenmiştir. Hidroliz sonrası sodyum kazeinatın asidik pH'lardaki çözünürlüğünün arttığı, 24 saatlik hidroliz sonrasında çözünürlüğün pH'dan bağımsız hale geldiği saptanmıştır. Sodyum kazeinatın emülsiyon oluşturma özelliği hidroliz sonrası genel olarak artış göstermiştir (Luo vd., 2014).

#### **2.4 Peptit-Peptit ve Peptit-Protein Etkileşimi**

Yapılan kaynak taramasında farklı enzimlerle hidrolize edilen kazein hidrolizat ve karışımlarındaki protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin fonksiyonel özellikler üzerindeki etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle aşağıda diğer süt proteinleri ile elde edilen sonuçlar sunulmuştur.

Hidroliz sırasında oluşan protein-protein, protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimi hidroliz düzeyini etkileyebilmektedir (Amiot vd., 2004; Uluko vd., 2016). Ayrıca bu tür etkileşimler elde edilen hidrolizatın fonksiyonel nitelikleri üzerinde de belirleyici olabilmektedir. Protein-peptit veya peptit-peptit etkileşiminin agregasyona neden olduğu belirlenmiştir (Creusot vd., 2006). Bu nedenle kazeinin farklı enzimlerle hidrolizi sonucunda elde edilen hidrolizatlarda da farklı düzeylerde protein-peptit veya peptit-peptit etkileşimleri gözlenebilme olasılığı söz konusudur.

Oda sıcaklığındaki peyniraltı suyu protein izolatına, bu proteinin hidrolize formu ilave edildiğinde agregasyonun gerçekleştiği saptanmıştır (Creusot ve Gruppen, 2008). Başka bir çalışmada ise  $\beta$ -laktoglobulinin ısı işlem ile gerçekleşen agregasyonunun  $\beta$ -laktoglobulinin çözünür formdaki bir hidrolizat bileşeninin ilavesiyle artış gösterdiği tespit edilmiştir. Hidrolizat içerisinde belirlenen 28 peptitten sadece 5 tanesinin  $\beta$ -laktoglobuline bağlanabildiği gösterilmiştir (Kosters vd., 2011).

Groleau vd. (2003) tarafından, peptit-peptit etkileşimini incelemek üzere  $\beta$ -laktoglobulin %5,6 hidroliz derecesine kadar tripsin ile hidrolize edilmiştir. pH 4'te gerçekleşen agregasyona bazılarının emülsifiyer veya biyoaktif özellikleri olan sınırlı sayıda peptitin etkileşime girmesinin neden olduğu saptanmıştır.

Peyniraltı suyu protein izolatından hazırlanan hidrolizatlardaki peptit-peptit ve protein-peptit etkileşimi Cresout vd. (2006) tarafından incelenmiştir. Hidrolizattaki peptit-peptit etkileşiminin (agregasyonun) artan hidroliz derecesi, sıcaklık ve iyonik güç ile arttığı belirlenmiştir. Küçük ve hidrofobik peptitleri içeren hidrolizatların peptit-peptit ve protein-peptit etkileşiminde daha etkili olduğu bildirilmiştir. Protein-peptit etkileşimini sıcaklık ve iyonik güç ile değiştirmenin mümkün olduğu ancak peptit-peptit etkileşiminde böyle bir olanağın bulunmadığı saptanmıştır. Bu nedenle peptit-peptit etkileşiminde hidrofobik etkileşimin, protein-peptit etkileşiminde ise hidrofobik çekim ve elektrostatik itme arasındaki dengenin önemli olduğu belirtilmiştir.

Kosters vd. (2013) tarafından  $\beta$ -laktoglobulin hidrolizatından saflaştırılmış 2 adet peptitin (f135-158 ve f135-162-SH)  $\beta$ -laktoglobulinin agregasyonu ve jelleşmesi üzerine etkisi incelenmiştir. Peptit-protein karışımının pH 7,0'de agregasyona uğradığı ancak izoelektrik noktanın altındaki bir değer olan pH 4,0'te agregasyonun oluşmadığı saptanmıştır. Serbest SH grubu içeren peptitin ısıtma sonucunda  $\beta$ -laktoglobulinin agregasyonunda 10 katlık artış sağladığı saptanmıştır.

## BÖLÜM III

### MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

Araştırma 2017-2018 yılları arasında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümünde yürütülmüştür. Araştırmada kullanılan çiğ süt Niğde İlindeki bir üreticiden, Endopeptidaz olan tripsin enzimi [domuz pankreasından elde edilen, 1 mg'ında en az 1000 N $\alpha$ -benzoil-L-arginin etil ester (BAEE) ünitesi aktivite içeren tripsin kullanılmıştır. Peptit bağıyla bağlı lizin ve arjinin aminoasitlerinin karboksil gruplarına özgündür. 1 BAEE ünitesi, substrat olarak N $\alpha$ -benzoil-L-arginin etil esterin kullanıldığı pH 7,6, 25°C ve 3,2 mL reaksiyon hacminde, 1 dakika içerisinde 253 nm dalga boyunda 0,001absorbans oluşturan tripsin miktarıdır] Sigma Aldrich (Almanya)'den ve Neutrase® 8.0 L enzimi [bir gramında 0,8 AÜ içeren *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilen bir metalo (Zn) endoproteazdır. Peptit bağıyla bağlı valin, lösin ve fenilalanin aminoasitlerinin karboksil gruplarına özgündür (Abd El-Salam ve El-Shibiny, 2017). 1 Anson ünitesi (AÜ): standart koşullar altında üre ile denatüre edilmiş hemoglobinden 1 dakikada 1 milieşdeğer tirozinin folin kimyasalı ile oluşturduğu absorbansa eşdeğer miktarda absorbans oluşturan trikloroasetik asitte çözünebilir ürün sağlayan enzim miktarıdır] Novozymes Enzim Dış Tic. Ltd. Şti. (İstanbul, Türkiye)'nden temin edilmiştir.

#### 3.2 Metot

##### 3.2.1 Kazein üretimi

Çiğ süt (20 L) yağın kolay ayrılabilmesi için çalkalamalı su banyosunda (St 30 Model, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş., Ankara) 50°C'ye kadar ısıtılmış ardından çiğ sütün yağı seperatör (model Asya Zenit 100, Silahtar Makina İmalat Sanayi Ticaret Ltd. Şti., Kayseri) ile uzaklaştırıldıktan sonra 75°C'de 1 dakika süreyle pastörize edilmiştir. Soğuk su yardımı ile 30-35°C'ye soğutulduktan sonra sütün pH değeri 2 M HCl ile 4,6'ya

düşürülmüş ve kazeinin çökmesi sağlanmıştır. On beş dakika dinlendirildikten sonra tek kat tülbentten geçirilerek serum kısmı uzaklaştırılmıştır. Kazein pıhtısına 50°C'deki 3L saf su ilave edilip 10 dakika karıştırılmış ve tülbent yardımıyla süzölmüştür. Bu yıkama işlem 3 kez tekrarlanarak kalıntıların uzaklaşması sağlanmıştır. Kazein pıhtısı liyofilizatör (ScanVac CoolSafe Pro95-15 Model, LaboGene ApS, Lyngø, Danimarka) yardımıyla donuk kurutulmuştur. Kuruyan kazein pıhtısı kahve değirmeni (Premier Prg 259-170 Watt Model, Nasmina İç ve Dış Ticaret A.Ş., İstanbul) ile öğütölüp 4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.2 Kazein hidrolizasyonu**

Liyofilizatörde kurutulup öğütölmüş kazeinin hidrolizasyonunda tripsin (Sigma Aldrich, Almanya) ve Neutrased 8.0 L (Novozymes, İstanbul) ticari enzimleri kullanılmıştır. Kazeinin %5'lik çözeltilerine 1:100 (enzim:kazein) oranında (10000 BAEE ünitesi:1 g kazein) tripsin ve 1:50 (enzim:kazein) oranında (0,016 Anson ünitesi:1 g kazein) Neutrased enzimi ilave edilerek %1, 5 ve 10 hidrolizasyon düzeylerine sahip hidrolizatlar üretilmiştir. Hidrolizasyon, tripsin için 55°C ve pH 8,0, Neutrased için 45°C ve pH 7,0 koşullarında gerçekleştirilmiştir. Tripsin ve Neutrased enzimleri saf su ile 1/10 oranında seyreltilip sürekli olarak karıştırılan %5'lik kazein çözeltilisine eklenmiştir. Hidroliz sırasında 0,5 N NaOH ilave ederek pH değeri sabit tutulmuştur. Hidrolizasyon tamamlandıktan sonra (harcanan 0,5 N NaOH hacmi ile belirlenmiştir) hidrolizatlar hızlıca 80°C'deki su banyosuna (St 30 Model, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş., Ankara) alınarak 20 dk enzim inaktivasyonu sağlanmış ve soğuk su yardımı ile soğutulup donuk kurutulmuştur. Kurutulan örnekler kahve değirmeninde öğütölerek kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanmıştır. Uygulanan ısı işlemi veya doğal olarak bulunabilecek enzimlerin oluşturduğu etkiyi dikkate almak için aynı işlemlere (Neutrased ve Tripsin ilavesi dışında) maruz bırakılan bir kontrol örneği de hazırlanmıştır.

### 3.2.3 Kazein hidrolizasyon düzeyinin belirlenmesi

Enzimatik hidrolizin düzeyi pH-stat metodu kullanılarak tespit edilmiştir (Adler-Nissen, 1986). pH-stat metodunda ortam pH'sı 0,5000 N NaOH ile sabit tutulmuştur. Hidroliz derecesinin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\text{Hidroliz derecesi (\%)} = B \times N_b \times \frac{1}{a} \times \frac{1}{P_M} \times \frac{1}{h_{top}} \times 100 \quad (3.1)$$

*B*: NaOH hacmi (mL)

*N<sub>b</sub>*: NaOH'ın normalitesi (0,5000 N)

*α*: α-NH<sub>2</sub> gruplarının ortalama iyonlaşma derecesi

$\alpha = \frac{\text{antilog (pH-pKa)}}{1+\text{antilog (pH-pKa)}}$  pH 7,0 ve 45°C'de hesaplanan değer yaklaşık 0,387; pH 8,0 ve 55°C için ise yaklaşık 0,909'dur.

*P<sub>M</sub>*: Protein miktarı (g)

*h<sub>top</sub>*: Toplam peptit bağı (mEq/g protein, kazein için 8,2)

### 3.2.4 Kurumadde analizi

Darası alınmış porselen kaplara homojen olarak (G2) yaklaşık 0,5 gram örnek (G1) tartılarak 105±2°C'lik hava akımlı etüvde (Termal G11600S model, Termal Laboratuvar Aletleri San. ve Tic. Koll. Şti., İstanbul) 4 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda kaplar desikatöre alınıp yarım saat süre ile soğuması sağlandıktan sonra ağırlıkları (G3) belirlenmiştir. Bu işleme sabit tartım elde edilinceye (iki tartım arasındaki fark 0,5 mg'dan az oluncaya) kadar devam edilerek yüzde (%) kurumadde miktarları aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Anonim, 1997).

$$\% \text{ Kurumadde} = [(G3 - G2) / G1] \times 100 \quad (3.2)$$

### 3.2.5 Protein analizi

Azot içeriklerinin belirlenmesinde mikro Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır (Anonim, 1997). Kjeldahl tüplerine yaklaşık 50 mg örnek tartılıp üzerine 2 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 µL %5'lik CuSO<sub>4</sub> ve 6 mL konsantre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edildikten sonra yaş yakma işlemine maruz bırakılmıştır. Örnekler Kjeldahl yakma ünitesinde yaklaşık 2 saat süreyle 350°C'de berraklaşmıncaya kadar yakılmıştır. Yakılan örnekler soğuduktan sonra destilasyon ünitesine yerleştirilmiştir. Destilasyon ünitesinde örnek üzerine 20 mL saf su ve 15-20 mL %40'luk (w/w) NaOH ilave edilerek destilasyon gerçekleştirilmiştir. Destilasyon ünitesinde örnek üzerine 15-20 mL %40'luk (w/w) NaOH ilave edilip destilatın 3-4 damla taşıro indikatörü içeren 25 mL %4'lük borik asit çözeltisi içerisinde toplanması sağlanmıştır. Destilasyon sonrası borik asit içerisinde toplanan destilat 0,0200 N HCl ile titre edilerek aşağıdaki eşitlik yardımıyla %azot oranları bulunmuştur. Azot oranları 6,38 faktörü ile çarpılarak örneklerin protein içerikleri hesaplanmıştır.

$$\%Azot = \frac{(V_1 - V_2) \times 0,014 \times N}{\text{Örnek miktarı (g)}} \times 100 \quad (3.3)$$

V<sub>1</sub> : Titrasyonda örnek için harcanan HCl hacmi (mL)

V<sub>0</sub> : Şahit için harcanan HCl hacmi (mL)

N : Titrasyonda kullanılan HCl'in normalitesi (0,0200 N)

### 3.2.6 Kül analizi

Kül miktarının belirlenmesi Anonim (1997)'de belirtilen şekilde örneklerin kül fırınında yakılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Darası alınmış porselen kroze içerisine (G2) yaklaşık 0,5 gram örnek (G1) tartılıp çeker ocağın içinde, elektrikli ısıtıcı üzerinde 30 dakika ön yakma işlemine maruz bırakılmıştır. Sonra örnekler kül fırınına (MKF 1063 model, Mikrotest, Laboratuvar Cihazları, Ankara) alınarak sıcaklık kademeli bir şekilde (90 dk'da bir 100°C arttırılarak) 550±15°C'ye çıkartılmıştır. Bu sıcaklıkta beyaz renkte kül elde edilinceye kadar (yaklaşık 4-8 saat) yakılmıştır. Yakılan örnekler desikatöre alınarak soğutulmuş ve

sonra tartılarak ağırlıkları (G3) kaydedilmiştir. Yüzde kül oranları aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\%K\ddot{u}l = [(G3-G2) / G1] \times 100 \quad (3.4)$$



### 3.2.7 Trisin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

Örneklerdeki proteinlerin moleküler ağırlık profilleri Schägger (2006) tarafından önerilen trisin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (Trisin-SDS-PAGE) tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Yığıma jeli (stacking gel) %4,125 ve ayırma jeli (separating gel) ise %16,5 akrilamid konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Kullanılan çözeltiler ve jel kompozisyonu Çizelge 3.1’de belirtilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Trisin-SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltiler ve jel kompozisyonu

Örnek hazırlama çözeltisi	
SDS (g)	1,2
Merkaptoethanol (g)	0,6
Gliserol (g)	3,0
Coomasie Brilliant Blue G250 (mg)	5,0
1M Tris/HCl (pH 7,0) (mL)	1,5
Son Hacim (su ile tamamlanır) (mL)	10,0

Bileşen	Anot Tamponu (10×)	Katot Tamponu (10×)	Jel Tamponu (3×)
Tris (M)	1,0	1,0	3,0
Trisin (M)	-	1,0	-
HCl (M)	0,225	-	1,0
SDS (% , m/v)	-	1,0	0,3
pH	8,90	8,25	8,45

Bileşen	Yığıma jeli (%4,125)	Ayırma jeli (%16,5)
Akrilamid-Bisakrilamid (%49,5T, m/v) (mL)	1	10
Jel Tamponu (3x) (pH 8,45) (mL)	3	10
Gliserol (g)	-	3
APS (%10, m/v) (µL)	90	100
TEMED (%99, m/v) (µL)	9	10
Son Hacim (su ile tamamlanır) (mL)	12	30

Örnekler yığıma jelinden çıkıncaya kadar 30 V sabit voltaj uygulanmıştır. Örneklerin ayırma jeline girmesiyle birlikte voltaj kademeli olarak 300 V’a kadar çıkartılarak elektroforez işleminin 9 saat içerisinde tamamlanması sağlanmıştır. Koşurma sonrasında

jel fiksasyon çözeltilisinde (%50 metanol,%10 asetik asit) 1 saat, boyama çözeltilisinde (%10 asetik asit, %0,025 Coomassie Brilliant Blue G 250) 1 gece bekletilmiştir. Boyanan jel, boya giderme çözeltilisine (%10 asetik asit) aktarılıp, birkaç kez değiştirilerek boyanın aşırısı uzaklaştırılmıştır. Jelin arka planı yeterince açıldıktan sonra görüntüleme sistemi (Biorad Moleculer Imager, Gel Doc XR+, Amerika Birleşik Devletleri) yardımıyla jelin fotoğrafı çekilmiştir.

### **3.2.8 Protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin oluşturulması**

Hidroliz düzeyi %1, 5 ve 10 olan hidrolizatların öncelikle %5'lik çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiler 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra (Çizelge 3.2) 75°C'de 10 dk ısı işleme tabi tutularak protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin oluşması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan örnekler donuk kurutulup kahve değirmeninde öğütülmüş ve kullanılıncaya kadar 4°C'de depolanmıştır.

### **3.2.9 İşlevsel özelliklerin belirlenmesi**

#### **3.2.9.1 Protein çözünürlüğünün belirlenmesi**

Proteinlerin çözünürlük profilleri Beuchat vd. (1975) tarafından belirtilen yöntemle göre saptanmıştır. %5 (m/v)'lik protein dispersiyonları hazırlanarak pH değerleri 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 ve 11,0 olacak şekilde ayarlanmıştır (0,1-1,0 N NaOH veya 0,1-1,0 N HCl kullanılarak). Her 30 dakikada bir pH değerleri kontrol edilerek oda sıcaklığında 90 dakika süreyle çalkalamalı inkübatörde karıştırıldıktan sonra 4000 x g'de 30 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Sıvı fazın absorbans değeri spektrofotometre (Evolution 300 UV-Vis spektrofotometre, Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri) yardımıyla 280 nm'de okunmuş ve çözünürlük aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Çözünürlük (\%)} = \text{SP} \times 100 / \text{TP} \quad (3.5)$$

SP: Sıvı fazdaki çözünür proteinlerin 280 nm'deki absorbans değeri

TP: Başlangıçtaki toplam proteinin 280 nm'deki absorbans değeri

**Çizelge 3.2.** Deneme örneklerinin bileşimi

<b>Örnek No</b>	<b>Karışım (1:1)</b>
1	Kontrol (Asit Kazein)
2	Tripsin (% 1 hidroliz)
3	Tripsin (%5 hidroliz)
4	Tripsin (% 10 hidroliz)
5	Neutrase (%1 hidroliz)
6	Neutrase (%5 hidroliz)
7	Neutrase (% 10 hidroliz)
8	Kontrol + Tripsin (% 1)
9	Kontrol + Tripsin (% 5)
10	Kontrol + Tripsin (% 10)
11	Kontrol + Neutrase (% 1)
12	Kontrol + Neutrase (%5)
13	Kontrol + Neutrase (% 10)
14	Tripsin (% 1) + Neutrase (% 1)
15	Tripsin (% 1) + Neutrase (% 5)
16	Tripsin (% 1) + Neutrase (% 10)
17	Tripsin (% 5) + Neutrase (% 1)
18	Tripsin (% 5) + Neutrase (% 5)
19	Tripsin (% 5) + Neutrase (% 10)
20	Tripsin (% 10) + Neutrase (% 1)
21	Tripsin (% 10) + Neutrase (% 5)
22	Tripsin (% 10) + Neutrase (% 10)

### **3.2.9.2 Su ve yağ tutma kapasitesinin belirlenmesi**

Protein örneklerinin su ve yağ tutma kapasiteleri Naczk vd. (1985) tarafından bildirilen yöntemle göre saptanmıştır. Su tutma kapasitesi için 0,5 g örnek üzerine 4 mL saf su ilave edilerek toplam 70 dk süre ile her 10 dk'da bir 30 saniye baget yardımıyla karıştırılmıştır. Bu işlem sonunda örnekler 2000 x g ve 25°C'de 15 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra, tüplerin ağız kısmı zeminle 45'lik açı oluşturacak şekilde 10 dk boyunca sıvı fazın süzülmesi sağlanmıştır. Sıvı fazdan arındırılmış olan katı kısım tartılarak ağırlık artışı belirlenmiştir. Sonuçlar g su/g örnek şeklinde hesaplanmıştır.

Yağ tutma kapasitesinde ise 0,5 g örnek üzerine 3 mL ticari ayçiçeği yağı ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım toplam 30 dakika süre ile her 5 dakikada bir 30 saniye boyunca bağıt kullanılarak karıştırılmıştır. Karıştırılan örnekler 1600 x g ve 25°C’de 25 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerin sıvı fazı uzaklaştırıldıktan sonra tüpler ters çevrilerek 5 dakika boyunca sıvı fazın süzülmesi sağlanmıştır. Sıvı fazdan arındırılmış olan katı kısım tartılarak ağırlık artışı belirlenmiştir. Sonuçlar g yağ/g örnek olarak ifade edilmiştir.

### 3.2.9.3 Köpük kapasitesi ve stabilitesinin belirlenmesi

Örneklerin oluşturduğu köpüklerin kapasitesi ve stabilitesi çırpma yöntemiyle belirlenmiştir. 0,5 g örnek üzerine saf su ilave edilerek hacmi 40 mL’ye tamamlanmıştır (%1,25 m/v). Hazırlanan dispersiyon (pH 7,0) homojenizatör ile 10000 devir/dk’da 2 dakika süreyle karıştırılarak köpük oluşumu sağlanmış ve hemen 100 mL’lik silindire alınıp toplam hacim ve sıvı fazın hacmi kaydedilmiştir. Örneklerin köpük kapasiteleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Moure vd., 2001).

$$\text{Köpük Kapasitesi (\%)} = \frac{V_1 - V_2}{V_2} \times 100 \quad (3.6)$$

$V_1$  : Homojenizasyon sonrası toplam hacim

$V_2$  : Homojenizasyon öncesi toplam hacim

Örneklerin köpük stabilitesi ise 10, 30, 60, 90 ve 120 dakika zaman aralıklarında köpük hacmindeki değişim ölçülerek hesap edilmiştir (Moure vd., 2001).

$$\text{Köpük stabilitesi (\%)} = V_t \times 100 / V_k \quad (3.7)$$

$V_t$  : t zamanındaki köpük hacmi

$V_k$  : Homojenizasyon sonrası 0. dakikadaki köpük hacmi

### 3.2.9.4 Emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksinin belirlenmesi

Örneklerin emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) Pearce ve Kinsella (1978) tarafından belirtilen metoda göre ölçülmüştür. %0,1 (m/v)'lik 20 mL protein dispersiyonu (pH 7,0) ve 6,6 mL ayçiçeği yağı emülsiyon oluşturmak amacıyla homojenizatör ile 80, kademedede (yaklaşık 18000 devir/dk) 1 dk süreyle homojenize edilmiştir. Emülsiyonun alt kısmından (sıvı faz) alınan 50 µL örnek 5 mL'ye %0,1'lik (m/v) sodyum dedosil sülfat (SDS) ile seyreltilmiştir (1:100 dilüsyon). Karışımın 500 nm'deki absorbansı (0. dakikadaki) kullanılarak aşağıdaki eşitlik yardımıyla EAI değeri hesaplanmıştır.

$$EAI \text{ (m}^2\text{/g)} = \frac{2 \times 2,303 \times A_0 \times N}{c \times \phi \times 10000} \quad (3.8)$$

$A_0$  : 0. dakikadaki absorbans

$N$  : Seyreltme faktörü (100)

$c$  : Protein dispersiyonun başlangıç protein konsantrasyonu (0,001 g/mL)

$\phi$  : Yağın hacimsel fraksiyonu (6,6/26,6 = 0,248)

Örneklerin ESI değerleri, emülsiyonun 10 dakika bekletilmesinden sonra alt kısmından (sıvı faz) alınan 50 µL örneğin 5 mL'ye %0,1'lik (w/v) SDS ile seyreltilmesi ve absorbansının 500 nm'de okunması (10. dakikadaki) sonucunda elde edilen verilerden aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$ESI = A_0 \times t / A_0 - A_{10} \quad (3.9)$$

ESI : Dakika

$A_0$  : 0. dakikadaki absorbans

$A_{10}$  : Homojenizasyon işleminden 10 dakika sonra okunan absorbans

$t$  : Emülsiyonun bekleme süresi (10 dakika)

### 3.2.9.5 İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen verilere varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve ortalamalar arasındaki farklılık ise  $p < 0,05$  düzeyinde Duncan testi ile belirlenmiştir.



## BÖLÜM IV

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 4.1 Protein Hidrolizi

Tripsin ve Neutrase enzimleri kullanılarak asit kazeinin farklı düzeylerde hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla asit kazeinin %5'lik çözeltisine 1:100 (10000 N $\alpha$ -benzoil-L-arginin etil ester ünitesi/g kazein) oranında tripsin ve 1:50 (0,016 Anson ünitesi/g kazein) oranında Neutrase enzimi ilave edilmiştir. Hidroliz düzeyi pH-stat yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hidroliz sırasında harcanan 0,5000 N NaOH çözeltisinin hacmi sabit tutularak hedeflenen %1, 5 ve 10 hidroliz düzeylerine ulaşmak mümkün olmuştur.

Hidrolizasyon derecesi yardımıyla hidrolizatlardaki ortalama peptit zincir (aminoasit sayısı) uzunluğu (ortalama peptit zincir uzunluğu= 100/%hidrolizasyon derecesi) belirlenebilmektedir (Adler-Nissen, 1986). Buna göre, %1 hidroliz derecesinde ortalama zincir uzunluğu 100 aminoasit, %5 hidrolizasyon derecesinde 20 aminoasit ve %10 hidroliz derecesinde ise 10 aminoasit olarak belirlenmiştir.

#### 4.2 Asit Kazein ve Hidrolizatların Bileşimi

Asit kazein ve hidrolize kazein örneklerinin su, kül ve protein içerikleri Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Çizelgeden de görüldüğü üzere örneklerin su içerikleri %1,87-4,78 arasında değişim göstermiştir. Varyans analizi örneklerin su içerikleri arasında önemli bir farklılık olduğunu ortaya koymuştur ( $p < 0,001$ ). Bunun üzerine yapılan Duncan testi sonucunda, su içerikleri bakımından asit kazein (AK), 1T, 5N ve 10N örnekleri arasında önemli bir farklılık bulunmazken ( $p > 0,05$ ), bu örnekler 5T, 10T ve 1N örneklerinden önemli ölçüde farklılık ( $p < 0,05$ ) ortaya koymuşlardır. Örneklerin su içeriklerindeki değişim hidroliz derecesinden bağımsız olarak gerçekleştiğinden gözlenen farklılığın kontrol edilemeyen hatalardan kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Asit kazein ve hidrolizatların su, kül ve protein içerikleri

Örnek	Su (%) <sup>1</sup>	Kül (%)	Protein (%)
AK	2,16±0,057 <sup>a</sup>	1,54±0,354 <sup>a</sup>	96,81±3,933
1T	2,56±0,173 <sup>a</sup>	3,97±0,036 <sup>b</sup>	94,02±0,497
5T	3,77±0,031 <sup>b</sup>	4,49±0,100 <sup>c</sup>	97,29±1,520
10T	4,78±0,527 <sup>c</sup>	5,41±0,026 <sup>d</sup>	94,10±2,786
1N	4,35±0,248 <sup>bc</sup>	3,76±0,285 <sup>b</sup>	92,83±1,652
5N	1,87±0,114 <sup>a</sup>	4,66±0,036 <sup>c</sup>	92,62±1,961
10N	2,05±0,413 <sup>a</sup>	5,17±0,053 <sup>d</sup>	92,76±1,226

<sup>1</sup>Ortalama ± standart sapma

a, b, c, d: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır (p<0,05)

AK: Asit kazein

1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekler

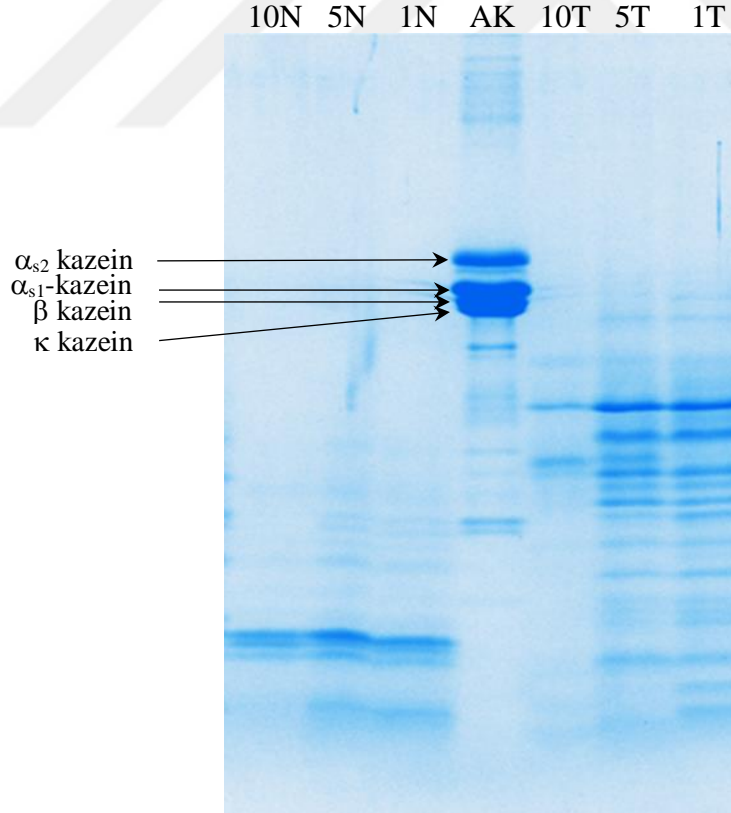
Deneme örneklerinin kül içerikleri de su içeriklerine benzer şekilde istatistiksel olarak önemli bir farklılık ortaya koymuştur (p<0,001). Ancak örneklerin kül içerikleri hidroliz derecesine paralel olarak artış göstermiştir. En düşük kül içeriğine %1,54 ile asit kazein örneği sahip olmuştur. Hidroliz düzeyi %1 olan 1T ve 1N örnekleri benzer kül içeriği göstermiştir (p>0,05). Aynı şekilde %5 hidroliz düzeyine sahip örnekler (5T ve 5N) ile %10 hidroliz düzeyine sahip örnekler (10T ve 10N) kendi aralarında benzerlik göstermişlerdir. Bu durumun, artan hidroliz düzeyine bağlı olarak pH değerini sabit tutmak için kullanılan NaOH miktarının da artış göstermesinden kaynaklandığı değerlendirilmektedir.

Örneklerin protein içerikleri oldukça yüksek bir şekilde %92,62-97,29 arasında değişim göstermiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda, örneklerin protein içerikleri arasında önemli bir farklılık olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (p>0,05). Beklendiği gibi, protein içerikleri hidroliz derecesinden bağımsız bir değişim göstermiştir.

### 4.3 Trisin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Trisin-SDS-PAGE)

Asit kazein ve hidrolizatların moleküler ağırlık profillerini belirlemek için gerçekleştirilen Trisin-SDS-PAGE analizine ait elektroforetogram Şekil 4.1'de sunulmuştur. Şekilden

görüldüğü üzere her iki enzim de hidroliz derecesine ve özgünlüklerine paralel bir moleküler ağırlık dağılımı oluşturmuştur. Tripsine oranla Neutrase enziminin, 10N, 5N ve 1N hatlarından da izlenebileceği gibi daha küçük molekül ağırlıktaki peptitlerin oluşumunu sağladığı (6,5 kDa'dan küçük), %1, 5 ve 10 hidroliz düzeyleri arasında ise önemli bir farklılık oluşturmadığı görülmektedir. Diğer taraftan tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizasyon sonucunda 17,0 kDa'dan küçük peptitlerin oluştuğu ve hidroliz dereceleri arasındaki farklılığın (hat 1T, 5T ve 10T) daha belirgin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Bu durumun, tripsinin sadece iki (lizin ve argininin karboksil ucundan), Neutrase'nin ise üç (valin, lösin ve fenilalaninin karboksil ucundan) noktadan hidroliz gerçekleştirmesinden kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir. Chobert vd. (1988a) ile Luo vd. (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da benzer bir şekilde tripsin hidrolizi ile elde edilen hidrolizatların yaklaşık 15 kDa'dan daha küçük peptitler içerdiği belirlenmiştir.



**Şekil 4.1.** Asit kazein ve hidrolizatlara ait Trisin-SDS-PAGE elektroforetogramı AK: Asit kazein, 1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri, 1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

## 4.4 Asit Kazein ve Hidrolizatların Fonksiyonel Özellikleri

### 4.4.1 Protein çözünürlüğü

Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının farklı pH değerlerindeki (1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 ve 11,0) protein çözünürlükleri Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Varyans analizi sonucunda örnek, pH ve örnek-pH etkileşiminin istatistiksel olarak önemli düzeyde bir farklılık ortaya koyduğu saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). pH 1,0’da en düşük çözünürlük %19,27 ile asit kazein örneğine ait bulunmuştur. Tripsin enzimi ile değişen düzeylerde gerçekleştirilen hidroliz, bu pH değerindeki çözünürlüğü %50’nin üzerine çıkartmış olup 1T (%54,72), 5T (%53,23) ve 10T (%55,68) örneklerinin çözünürlükleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ). Neutrase ile gerçekleştirilen hidroliz sonucunda ise çözünürlük daha da artarak %60’ın üzerine çıkmıştır. Ancak tripsin örneklerinin aksine 1N (%61,73), 5N (%81,27) ve 10N (%75,02) örneklerinin çözünürlükleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Ayrıca %5 hidroliz düzeyindeki örnek (%81,27), %10 hidroliz düzeyindeki örnekten (%75,02) anormal bir şekilde daha yüksek çözünürlük göstermiştir. Bu durumun 10N örneğindeki peptitlerin agregasyona uğramasından ileri geldiği değerlendirilmektedir. Asit kazein ve tripsin hidrolizatları etkileşimi sonucu elde edilen örneklerin çözünürlükleri %40,11 (AK+1T), %31,92 (AK+5T) ve %26,56 (AK+10T) şeklinde bu iki bileşen arasında yer almış; ilginç bir şekilde hidroliz düzeyi arttıkça, çözünürlük de istatistiksel olarak önemli bir düzeyde azalma göstermiştir ( $p < 0,05$ ). Bu durum, hidroliz düzeyindeki artış ile küçülen peptit boyutunun protein-peptit etkileşimini arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Asit kazein ve Neutrase hidrolizatları etkileşimi sonucu elde edilen örneklerin çözünürlükleri %19,76 (AK+1N), %30,00 (AK+5N) ve %68,91 (AK+10N) şeklinde etkileşimleri oluşturmak için kullanılan iki bileşen arasında yer almış ve hidroliz düzeyine paralel olarak çözünürlükleri de artmıştır. Hidrolizatların kendi aralarındaki etkileşim sonucunda hazırlanan örneklerin çözünürlükleri ise beklentilerin tersine hidroliz düzeyinden bağımsız olarak düzensiz bir değişim göstermiştir.

**Çizelge 4.2.** Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının protein çözünürlükleri (%)

Örnek	pH <sup>1</sup>					
	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0	11,0
AK	19,27±0,267	39,83±0,077	10,56±2,330	49,50±0,707	99,10±0,141	99,20±0,424
1T	54,72±2,684	52,76±0,772	6,61±0,126	54,10±1,822	58,86±1,470	99,50±0,707
5T	53,23±1,315	51,37±0,351	8,09±0,070	63,84±1,316	66,95±2,720	99,50±0,707
10T	55,68±0,208	47,11±0,846	44,92±1,085	73,15±1,609	75,65±2,079	99,50±0,707
1N	61,73±0,025	67,76±2,492	35,72±0,771	60,94±1,045	74,10±0,923	99,50±0,707
5N	81,27±0,746	66,88±3,486	69,49±1,700	95,14±3,136	96,38±2,118	99,50±0,707
10N	75,02±0,041	73,84±0,385	81,17±1,164	87,79±1,692	85,15±1,357	99,50±0,707
AK+1T	40,11±2,263	44,79±0,553	32,59±0,445	84,42±1,561	85,15±2,573	99,50±0,707
AK+5T	31,92±0,660	41,77±0,118	31,39±0,284	98,17±0,643	97,19±0,957	99,50±0,707
AK+10T	26,56±1,696	26,72±0,301	26,50±0,355	88,50±0,135	87,29±1,424	99,50±0,707
AK+1N	19,76±1,077	17,45±0,213	30,94±0,146	98,50±0,707	98,75±0,354	99,50±0,707
AK+5N	30,00±3,035	38,80±0,448	28,33±0,832	96,27±1,276	94,61±0,055	99,50±0,707
AK+10N	68,91±1,374	67,70±0,753	80,30±3,077	98,50±0,707	98,75±0,354	99,60±0,566
1T+1N	75,40±0,145	89,78±0,101	87,35±0,957	98,50±0,707	98,75±0,354	99,50±0,707
1T+5N	51,10±1,417	53,59±0,871	57,50±0,101	78,22±0,025	87,81±0,066	99,65±0,495
1T+10N	69,39±0,027	71,55±0,427	87,97±0,681	98,99±1,395	99,75±0,354	99,90±0,141
5T+1N	40,83±1,328	55,41±0,367	50,33±1,125	82,50±0,921	93,72±1,004	99,50±0,707
5T+5N	55,63±1,025	61,47±2,202	66,64±0,206	90,14±0,572	98,50±0,707	99,50±0,707
5T+10N	67,65±0,396	67,46±0,719	76,23±0,290	93,98±1,289	98,50±0,707	99,50±0,707
10T+1N	55,79±0,278	51,15±0,384	61,46±0,257	85,22±1,899	98,18±0,053	99,50±0,707
10T+5N	61,11±0,829	58,24±0,036	68,17±0,021	91,25±0,951	94,79±0,394	99,60±0,566
10T+10N	74,36±2,178	73,49±0,363	81,64±0,065	90,11±0,626	99,25±0,354	99,70±0,424

<sup>1</sup>Ortalama ± standart sapma

<sup>2</sup>Aynı sütun veya satırda bulunan iki ortalama arasındaki farklılık 2,39 kritik değerinden büyük ise ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır (p<0,05)

AK: Asit kazein

1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekler

Ortam pH'sının 3,0'e yükselmesiyle genel olarak örneklerin çözünürlükleri artış veya önemsiz azalışlar göstermiştir. Bu pH değerindeki en yüksek çözünürlüğe 10T+10N örneğinin yerine beklenmedik bir şekilde %89,78 ile 1T+1N örneği sahip olmuştur. Asit kazeine (%39,83) göre 3,0 pH değerlerinde AK+10T (%26,72) ve AK+1N (%17,45) örneklerinin daha düşük bir protein çözünürlüğüne sahip olmaları, çözünürlük üzerine protein-peptit etkileşiminin önemli etkisinin olduğunu göstermiştir.

Ortam pH'sının, kazeinin izoelektrik noktası olan 4,6-4,7 değerine yakın bir pH değeri olan 5,0'a yükselmesiyle birlikte AK, 1T, 5T, 1N, AK+1T, AK+5T ve AK+5N dışındaki örneklerin çözünürlükleri artış göstermiştir. Bu durum, hidroliz sonucunda kazeinin izoelektrik noktasının kısmen de olsa değişikliğe uğradığını göstermektedir. pH değerinin 7,0'a yükselmesiyle bütün örneklerin çözünürlükleri artış göstermiştir. Bu pH değerinde en yüksek çözünürlük %98,99 ile 1T+10N örneğinde gözlenmiştir. En düşük çözünürlük ise %49,5 ile asit kazein örneğine ait olmuştur. pH değerinin 9,0 ve 11,0'a yükseltilmesiyle çözünürlük hemen hemen bütün örneklerde %100'e ulaşmıştır.

Protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimini çalışmamızdakine benzer bir şekilde inceleyen herhangi bir kaynağa rastlanmamıştır. Bu nedenle protein çözünürlüğü sonuçlarımızı literatür verileriyle doğrudan karşılaştırmak mümkün olamamıştır.

Tripsin ile kazeinin %4,3, 8,0 ve 9,9 düzeylerinde hidrolize edilmesi sonucunda çalışmamızdakine benzer şekilde pH 4-5 aralığında hidrolizatların çözünürlüğünde artış gözlenmiştir (Chobert vd., 1988a). Yine benzer şekilde *Staphylococcus aureus* V8 proteazı ile elde edilen hidrolizatların pH 4,0-5,0 arasındaki çözünürlüğü kazeinden çok daha yüksek bulunmuştur (Chobert vd.,1988b).

Haque ve Mozaffar (1992) asit kazeini, immobilize tripsin, kimotripsin ve Rhozyme-41 enzimleriyle farklı düzeylerde hidrolize ettiklerinde, hidrolizatların çözünebilirliğinin kontrol örneğine göre çok daha yüksek olduğunu bulunmuşlardır. Bu araştırmacılar da çalışmamızdakine benzer şekilde, hidroliz derecesiyle uyumlu olmayan bir çözünürlük düzeyi tespit etmişlerdir.

Sodyum kazeinatın Protamex enzimi ile %2,7, 5,3 ve 13,3 düzeyinde hidrolize edildiği çalışmada, hidroliz işleminin izoelektrik nokta etrafındaki çözünürlüğü önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Flanagan ve FitzGerald, 2002).

Sodyum kazeinatın tripsin enzimi ile %14,9-20,7 arasında hidrolizasyonu sonucunda, hidroliz işleminin izoelektrik nokta etrafındaki çözünürlüğü önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir (Luo vd. 2014). Bu çalışmada sodyum kazeinatın pH 3,0'daki çözünürlüğü

bizim çalışmamızdakinden çok daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun çözünürlük analizinde çalışmamızda %5'lik kazein çözültisinin, Luo vd. (2014) tarafından ise %1'lik kazein çözültisinin kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### **4.4.2 Su tutma kapasitesi**

Proteinlerin su ile etkileşimi, gıdaların hem tat ve kokusunu hem de dokusunu şekillendirmesi açısından önemlidir. Hidroliz sonucunda polar aminoasitlerin ve iyonlaşabilir grupların açığa çıkması, genellikle su tutma kapasitesini arttırmaktadır (Vioque vd., 2000).

Su tutma kapasitesi analizi için, üzerine 4 mL saf su ilave edilen 0,5 g örnek, toplam 70 dakika süre ile her 10 dakikada bir 30 saniye baget yardımıyla karıştırılmıştır. Bu koşullarda sadece asit kazein örneklerinin su tutma kapasitesi (3,01±0,199 g su/g örnek) ölçülebilmektedir. Diğer örnekler analiz koşullarında çözündüğü için su tutma kapasitelerinin doğru bir şekilde ölçülmesi mümkün olamamıştır. Hidrolizasyon derecesinin artmasına paralel olarak suda çözünür hale gelen peptitlerin, analiz sırasında uygulanan santrifüj işlemi ile ortamdan uzaklaşması sonucunda su tutma kapasitesinin düşebileceği Guan vd. (2007) tarafından da belirtilmiştir. Çalışmamızda incelenen asit kazein örneğine ait su tutma kapasitesinin, Mulvihill (1992) tarafından kazein ve kazeinat örnekleri için (0,7-3,8 g su/g örnek), Chandi ve Sogi (2007) tarafından kazeinat örnekleri için (2,48 g su/g örnek) ve Yang vd. (2016) tarafından kazeinat örnekleri için (2,25 g su/g örnek) bildirilen su tutma kapasitelerine benzer olduğu görülmüştür. Crowley vd. (2002) tarafından gerçekleştirilen araştırmada, Neutrase, Protamex, Alcalase, Flavourzyme ve PTN 3.0S ticari enzimleriyle sodyum kazeinatın %1 düzeyinde hidrolize edilmesi sonucu elde edilen hidrolizatların su tutma kapasiteleri sodyum kazeinata oranla daha düşük bulunmuştur. Hidrolizatlar arasında en yüksek su tutma kapasitesine Neutrase ile hidrolize edilen örneğin sahip olduğu belirlenmiştir.

#### 4.4.3 Yağ tutma kapasitesi

Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının yağ tutma kapasiteleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2’de sunulmuştur. Varyans analizi sonucunda örneklerin yağ tutma kapasiteleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ( $p<0,001$ ).

Çizelge 4.3. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının yağ tutma kapasiteleri

Örnek	Yağ tutma kapasitesi (g yağ/g örnek) <sup>1</sup>
AK	1,02±0,126 <sup>abc</sup>
1T	1,87±0,003 <sup>h</sup>
5T	1,99±0,103 <sup>hi</sup>
10T	1,45±0,047 <sup>defg</sup>
1N	1,64±0,110 <sup>efgh</sup>
5N	1,77±0,033 <sup>fgh</sup>
10N	1,38±0,037 <sup>cdef</sup>
AK+1T	1,27±0,020 <sup>cde</sup>
AK+5T	1,77±0,079 <sup>fgh</sup>
AK+10T	1,84±0,081 <sup>gh</sup>
AK+1N	2,32±0,047 <sup>i</sup>
AK+5N	2,04±0,003 <sup>hi</sup>
AK+10N	1,67±0,033 <sup>efgh</sup>
1T+1N	0,74±0,153 <sup>a</sup>
1T+5N	1,65±0,177 <sup>efgh</sup>
1T+10N	0,99±0,299 <sup>abc</sup>
5T+1N	1,34±0,392 <sup>cde</sup>
5T+5N	0,81±0,084 <sup>ab</sup>
5T+10N	1,28±0,112 <sup>cde</sup>
10T+1N	1,17±0,246 <sup>bcd</sup>
10T+5N	1,44±0,321 <sup>defg</sup>
10T+10N	1,29±0,308 <sup>cde</sup>

<sup>1</sup>Ortalama ± standart sapma

a, b, c, d, e, f, g, h, i: Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır ( $p<0,05$ )

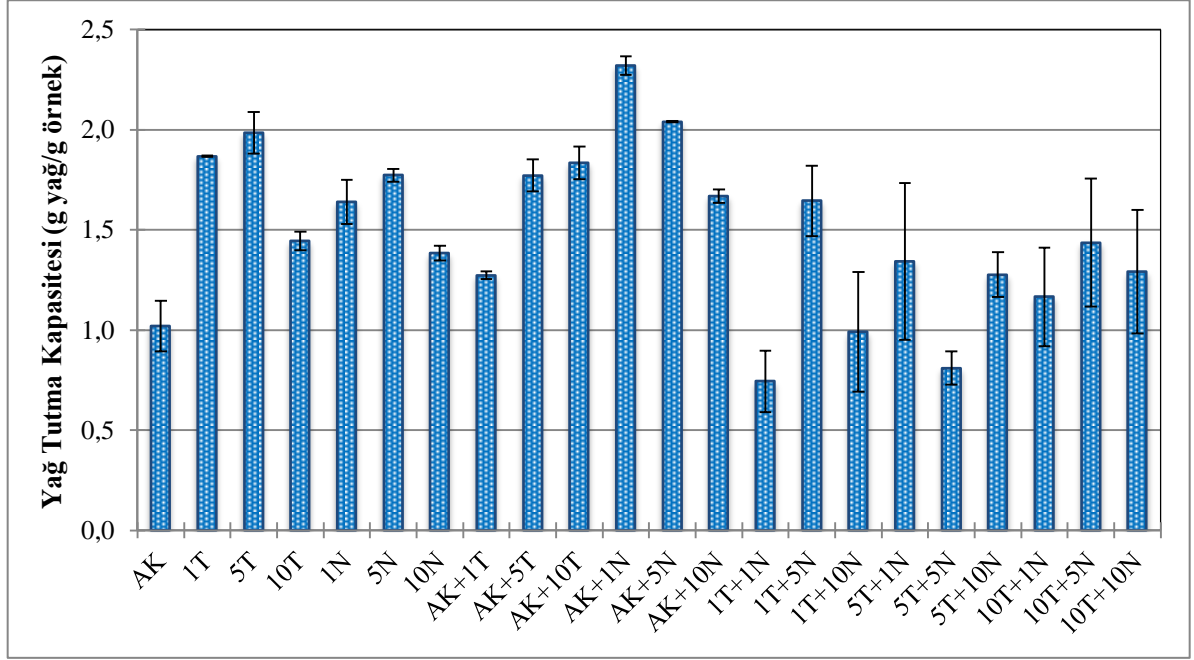
AK: Asit kazein

1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

En düşük yağ tutma kapasitesi 0,74 g yağ/g örnek ile 1T+1N örneğinde tespit edilmiş olmakla birlikte istatistiksel olarak AK, 1T+10N ve 5T+5N örnekleri arasında önemli bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ). En yüksek yağ tutma kapasitesi 2,32 g yağ/g örnek ile

AK+1N örneğinde tespit edilmiştir. Ancak bu örnek ile 5T ve AK+5N örneklerinin yağ tutma kapasiteleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Genel olarak her iki enzim ile hidroliz sonucunda elde edilen örneklerin (1T, 5T, 10T, 1N, 5N ve 10N) yağ tutma kapasitelerinde kazeine göre iyileşme sağlanmıştır. Bu durum, peptit boyutunun yağ tutma kapasitesinde önemli olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.



**Şekil 4.2.** Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının yağ tutma kapasiteleri (AK: Asit kazein; 1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri; 1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri)

Tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizasyonda, %5 hidroliz derecesine kadar yağ tutma kapasitesi artmış, ancak hidrolizin %10 düzeyine ulaşmasıyla (1,45 g yağ/g örnek) birlikte yağ tutma kapasitesinde önemli düzeyde azalma gerçekleşmiştir ( $p<0,05$ ). Benzer eğilim Neutrase enzimi ile de gözlenmiş olmakla birlikte bu örnekler arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Tripsin enzimi ile farklı düzeylerde hidroliz sonucunda üretilmiş kazein hidrolizatlarının asit kazein ile etkileşimi sonucunda (protein-peptit) hazırlanan örneklerin (AK+1T, AK+5T ve AK+10T) yağ tutma kapasiteleri, 1,27, 1,77 ve 1,84 g yağ/g örnek şeklinde hidroliz düzeyine bağlı olarak artış göstermiştir. AK+1T örneği (1,27 g yağ/g örnek) diğer iki

örnekten, AK+5T (1,77 g yağ/g örnek) ve AK+10T (1,84 g yağ/g örnek), önemli ölçüde düşük yağ tutma kapasitesine sahip olmuştur ( $p<0,05$ ). AK+10T örneği hariç, etkileşim sonucu hazırlanan örneklerin yağ tutma kapasiteleri, AK, 1T, 5T ve 10T örneklerinin yağ tutma kapasiteleri arasında yer almıştır. AK+10T örneği ise tek tek bileşenlerden daha yüksek yağ tutma kapasitesi (1,84 g yağ/g örnek) göstermiştir. Bu durum 10T örneği içerisinde yer alan peptitlerin AK ile yağ tutma kapasitesini arttıracak yönde etkileşime girdiğini göstermektedir. Hangi peptit veya peptitlerin bu etkiyi sağladığının belirlenmesinin, gıda uygulamaları açısından önemli katkıları olabileceği değerlendirilmektedir.

Neutrase enzimi aktivitesiyle farklı düzeylerde hidroliz edilmiş kazein hidrolizatlarının asit kazein ile etkileşimi sonucunda (protein-peptit) hazırlanan örneklerin (AK+1N, AK+5N ve AK+10N) yağ tutma kapasiteleri, tripsin ile hazırlanan örneklerde gözlenen durumun aksine 2,32, 2,04 ve 1,67 g yağ/g örnek şeklinde hidroliz düzeyine bağlı olarak azalış göstermiştir. AK+1N örneği (2,32 g yağ/g örnek) AK+10N (1,67 g yağ/g örnek) örneğinden önemli ölçüde yüksek yağ tutma kapasitesine sahip olmuştur ( $p<0,05$ ). Etkileşim sonucu hazırlanan örneklerin yağ tutma kapasiteleri, kendilerini hazırlamak için kullanılan AK, 1N, 5N ve 10N örneklerinin yağ tutma kapasitelerinden daha yüksek değerler göstermiştir. Özellikle, en yüksek yağ tutma kapasitesini AK+1N örneğinin göstermesi dikkat çekicidir. Bu durum, 5N, 10N ve özellikle de 1N örneği içerisinde bulunan peptitlerin AK ile yağ tutma kapasitesini arttıracak yönde etkileşime girdiğini göstermektedir.

Peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin (1T+1N, 1T+5N, 1T+10N, 5T+1N, 5T+5N, 5T+10N, 10T+1N, 10T+5N ve 10T+10N) yağ tutma kapasiteleri düzensiz bir değişim göstermiş ve genellikle kendilerini üretmek için kullanılan bileşenlerden daha düşük değerlere sahip olmuştur. Bu durum, peptit boyutu ve peptit-peptit etkileşiminin yağ tutma kapasitesinde önemli olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Çalışmamıza benzer şekilde, hidroliz işlemi sonucunda kazeinin yağ tutma kapasitesinin önemli ölçüde arttığı, en fazla artışın immobilize tripsin uygulaması ile elde edildiği belirlenmiştir (Haque ve Mozaffar, 1992). Asit kazeinin 1,00 g yağ/g örnek olan yağ tutma

kapasitesinin, tripsin ile %2, 3, 4 ve 5 düzeyinde hidroliz sonrasında sırasıyla 6,06, 4,53, 4,49 ve 1,54 g yağ/g örnek değerlerine yükseldiğini saptamışlardır. Ancak hidroliz düzeyindeki artışla birlikte yağ tutma kapasitesinin azalma gösterdiği tespit edilmiştir

Chandi ve Sogi (2007) kazeinin yağ tutma kapasitesini  $1,72 \pm 0,09$  g yağ/g örnek olarak belirlemiş olup çalışmamızda kazein için belirlenen değerden (1,02 g yağ/g örnek) daha yüksektir. Yang vd. (2016) tarafından asit kazein için saptanan yağ tutma kapasitesi (1,2 g yağ/g örnek) ise çalışmamızda bulunan değere benzerlik göstermektedir.

Protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimini çalışmamızdakine benzer bir şekilde inceleyen herhangi bir kaynağa rastlanmadığından protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin yağ tutma kapasitesini literatür verileriyle doğrudan karşılaştırmak mümkün olamamıştır.

#### **4.4.4 Köpük kapasitesi**

Bir proteinin köpük oluşturabilmesi için sıvı fazda çözünmesi, hızla hava su ara-yüzeyine soğurulması ve düz zincir haline geçerek hava kabarcığı etrafında ince yapışkan bir katmana dönüşmesi gerekir. Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının pH 7,0'daki köpük oluşturma kapasiteleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Varyans analizi sonucunda örneklerin köpük oluşturma kapasiteleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). En düşük köpük kapasitesi %53,8 ile 10N örneğinde tespit edilmiş olmakla birlikte istatistiksel olarak 5T+1N (%62,5) ve 5T+5N örnekleri arasında önemli bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0,05$ ). En yüksek köpük kapasitesi %150 ile AK örneğinde tespit edilmiş, ancak bu örnek ile 1N (%136,3) örneğinin köpük kapasiteleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık gözlenmemiştir ( $p > 0,05$ ). 1N örneğinin asit kazeine benzer bir köpük kapasitesi göstermesi, bu hidroliz sonucu oluşan küçük peptitlerin hava-su ara-yüzeyine daha hızlı soğurulmasına bağlanabilir.

**Çizelge 4.4.** Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının köpük kapasiteleri

Örnek	Köpük Kapasitesi (%) <sup>1</sup>
AK	150,0±0,00 <sup>h</sup>
1T	80,0±7,07 <sup>cde</sup>
5T	90,0±3,54 <sup>ef</sup>
10T	97,5±10,61 <sup>f</sup>
1N	136,3±19,45 <sup>h</sup>
5N	121,3±12,37 <sup>g</sup>
10N	53,8±8,84 <sup>a</sup>
AK+1T	75,0±17,68 <sup>bcde</sup>
AK+5T	76,3±8,84 <sup>bcde</sup>
AK+10T	80,0±7,07 <sup>cde</sup>
AK+1N	85,0±3,54 <sup>ef</sup>
AK+5N	81,3±5,30 <sup>de</sup>
AK+10N	90,0±7,07 <sup>ef</sup>
1T+1N	78,8±5,30 <sup>cde</sup>
1T+5N	75,0±0,00 <sup>bcde</sup>
1T+10N	83,8±1,77 <sup>def</sup>
5T+1N	62,5±3,54 <sup>ab</sup>
5T+5N	65,0±3,54 <sup>abc</sup>
5T+10N	81,3±1,77 <sup>de</sup>
10T+1N	75,0±0,00 <sup>bcde</sup>
10T+5N	68,8±1,77 <sup>bcd</sup>
10T+10N	77,5±7,07 <sup>bcde</sup>

<sup>1</sup>Ortalama ± standart sapma

a, b, c, d, e, f, g, h: Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır (p<0,05)

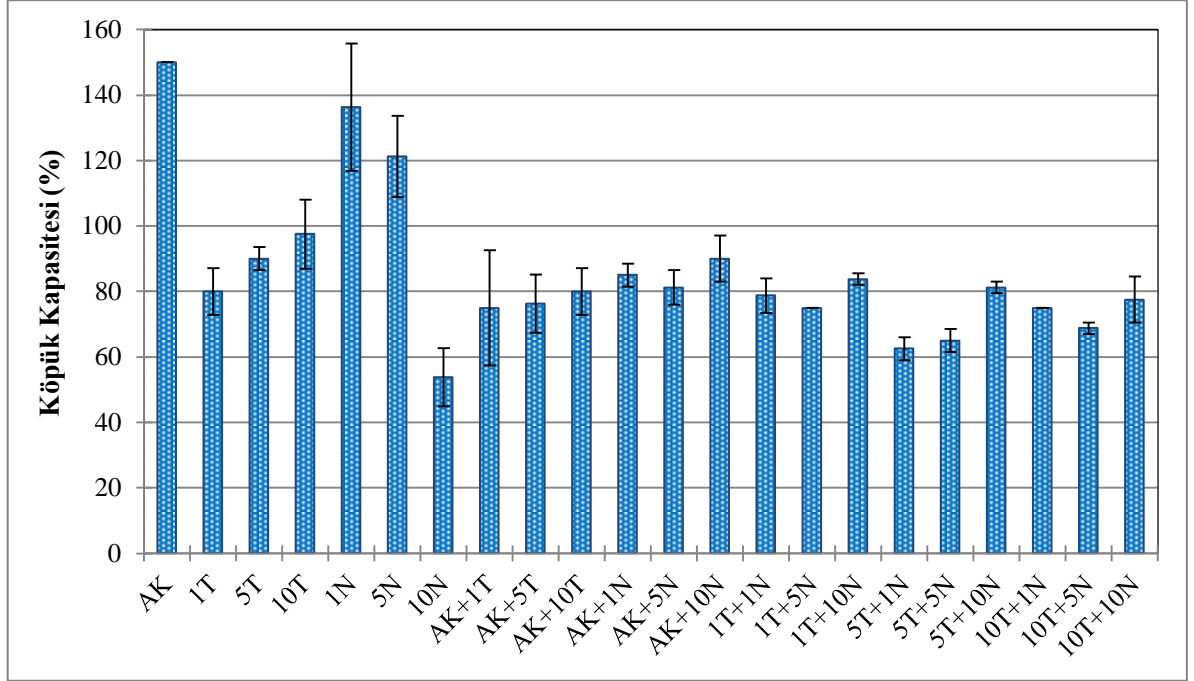
AK: Asit kazein

1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

Şekil 4.3'ten de görüldüğü üzere, tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizasyonda, hidroliz derecesi arttıkça köpük kapasitesi de artış göstermiştir. %1 (1T) hidroliz derecesine sahip örneğin %80,0'luk köpük kapasitesi, %5 (5T) hidroliz düzeyine sahip örneğin köpük kapasitesine benzerlik (p>0,05), ancak %10 (10T) hidroliz düzeyine sahip örneğin köpük kapasitesinden önemli ölçüde farklılık ortaya koymuştur (p<0,05). Diğer taraftan, 5T ve 10T örnekleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık tespit edilmemiştir (p>0,05). Neutrase enzimi ile hidrolizasyon, tripsine oranla tam tersi bir sonuç elde edilmesine yol

açmıştır. Neutrase enzimi ile hidrolizasyon düzeyinin artmasına paralel olarak köpük kapasitesi değerleri düşüş göstermiştir. En yüksek köpük kapasitesi değeri %136,3 ile 1N örneğine ait iken, 5N örneği %121,3 ve 10N örneği ise %53,8 köpük kapasitesi değerine sahip olmuştur. Bu üç örnek arasındaki farklılık istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.3.** Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının köpük kapasiteleri (AK: Asit kazein; 1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri; 1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri)

Tripsin enzimi ile farklı düzeylerde hidroliz sonucunda üretilmiş kazein hidrolizatlarının AK ile etkileşimi (protein-peptit) sonucunda hazırlanan örneklerin (AK+1T, AK+5T ve AK+10T) köpük kapasiteleri %75,0, 76,3 ve 80,0 şeklinde hidroliz düzeyine bağlı olarak önemsiz düzeyde artış göstermiştir ( $p>0,05$ ). Protein-peptit etkileşim sonucu hazırlanan örneklerin köpük kapasiteleri, AK, 1T, 5T ve 10T örneklerinin köpük kapasiteleri arasında yer almıştır. Bu durum tripsin hidrolizi sonucunda elde edilen peptitlerin AK ile köpük kapasitesini azaltacak şekilde etkileşime girdiğini göstermektedir.

Neutrase enzimi ile farklı düzeylerde hidroliz sonucunda üretilmiş kazein hidrolizatlarının AK ile etkileşimi (protein-peptit) sonucunda hazırlanan örneklerin (AK+1N, AK+5N ve

AK+10N) köpük kapasiteleri %85,0, 81,3 ve 90,0 şeklinde, hidroliz düzeyine bağlı olarak önemsiz düzeyde artış göstermiştir ( $p>0,05$ ). Protein-peptit etkileşimi sonucu hazırlanan örneklerin köpük kapasiteleri, AK (%150,0), 1N (%136,3) ve 5N (%121,3) örneklerinin köpük kapasitelerinden küçük, 10N (%53,8) örneğinin köpük kapasitesinden ise büyük çıkmıştır. Bu durum Neutrase hidrolizi sonucunda elde edilen peptitlerin AK ile köpük kapasitesini azaltacak şekilde etkileşime girdiğini göstermektedir.

Peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin (1T+1N, 1T+5N, 1T+10N, 5T+1N, 5T+5N, 5T+10N, 10T+1N, 10T+5N ve 10T+10N) köpük kapasiteleri düzensiz bir değişim göstermiş ve genellikle kendilerini üretmek için kullanılan bileşenlerden daha düşük değerlere sahip olmuştur. Bu durum, peptit boyutu ve peptit-peptit etkileşiminin köpük kapasitesini etkileyen önemli faktörler arasında yer aldığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Protamex enzimi ile %13,3 düzeyinde hidrolize edilen kazeinin hidrolize edilmemiş kazeine göre köpük kapasitesinde önemli ölçüde iyileşme sağlandığı belirtilmiştir. (Flanagan ve FitzGerald, 2002). Hidrolizatların köpük kapasitesindeki iyileşmenin, küçük ve amfifilik özelliği yüksek peptitlerin sıvı hava ara-yüzeyine soğrulabilme ve yeniden düzenlenebilme yeteneklerinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Damodaran, 1990).

Crowley vd. (2002) tarafından Neutrase, Protamex, Alcalase, Flavourzyme ve PTN 3.0S ticari enzimleriyle sodyum kazeinatın %1 düzeyinde hidrolize edildiği çalışmada, bütün hidrolizat örneklerinin pH 2,0, 7,5 ve 10'da hidrolize edilmemiş sodyum kazeinata oranla daha yüksek köpük kapasitesi sergilediği saptanmıştır.

Sodyum kazeinatı 11 farklı ticari enzim (Pem, Flavourzyme, Alcalase, Promod 184, Promod 258, Pepsin, Protex 6L, NewlaseF, Corolase PP, Corolase L10 ve Validase FP) ile hidrolize edene Van der Ven vd. (2002), bütün kazein hidrolizatlarının (hidrolizasyon derecesi %0,5-22,0) sodyum kazeinat kadar yüksek köpük kapasitesi gösterdiğini saptamışlardır. Bu nedenle kazein hidrolizatlarının köpük oluşturma yeteneklerinin peptitlerin moleküler ağırlık dağılımından etkilenmediği sonucuna ulaşmışlardır.

Pralea vd. (2011), sodyum kazeinatı kimotripsin ile farklı düzeylerde hidroliz edip (maksimum hidroliz derecesi %8,7) santrifüj işlemi sonrası sıvı fazı (pH 4,6'da çökmeyen kısım) donuk kuruttuktan sonra işlevsel özelliklerini incelemiştir. Köpük kapasitesi hidrolize olmamış kazein ile 10 dakika hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatta benzer bulunmuştur. Hidroliz süresinin 40 dakikanın üzerine çıkmasıyla birlikte köpük kapasitesi hafifçe azalma göstermiştir. Bu veriler, köpük kapasitesini arttırmak için sınırlı bir hidrolizin gerekli olduğunu ortaya koymuştur.

Protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimini çalışmamızdaki benzer bir şekilde inceleyen herhangi bir kaynağa rastlanmadığından protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin köpük kapasitesini literatür verileriyle doğrudan karşılaştırmak mümkün olamamıştır.

#### **4.4.5 Köpük stabilitesi**

Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının pH 7,0'daki köpük stabilite değerleri Çizelge 4.5'te sunulmuştur. Gerçekleştirilen varyans analizi sonucunda örneklerin köpük stabilite değerleri ve bekletme süreleri arasındaki farklılığın ve köpük stabilite değerleri ile bekletme süreleri arasındaki etkileşimin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ( $p < 0,001$ ).

Köpük stabilite bekletme süresine bağlı olarak bütün örneklerde önemli düzeyde azalma göstermiştir. 10 dakikalık bekletme süresi sonunda en düşük köpük stabilitesi değeri %6,2 ile 10N örneğinde tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Aynı dönemde ilginç bir şekilde en yüksek değere %54,6 ile AK+10N örneği sahip olmuştur. Bu dönemde 10N örneği gibi AK örneği de %23,9 ile düşük bir köpük stabilitesi değeri göstermiştir. Düşük köpük stabilite değerine sahip bu iki örneğin etkileşimi ile hazırlanan AK+10N örneğinin daha yüksek stabilite göstermesi protein-peptit etkileşiminin stabiliteye olumlu katkı sağladığını ortaya koymaktadır.

**Çizelge 4.5.** Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının köpük stabilite (%)

Örnek	Süre (Dakika) <sup>1,2</sup>				
	10	30	60	90	120
AK	23,9±0,13	13,4±0,92	5,0±1,44	1,0±1,41	0,0±0,00
1T	41,3±1,82	35,4±2,54	31,2±1,72	29,9±0,19	29,9±0,19
5T	46,6±9,37	37,8±6,28	33,2±1,71	32,6±0,79	32,6±0,79
10T	49,7±0,47	37,3±2,47	36,0±2,54	33,4±6,26	33,4±6,26
1N	21,3±3,11	3,4±0,09	1,6±0,13	1,1±0,09	0,0±0,00
5N	14,9±8,83	3,4±0,99	1,4±0,32	1,4±0,32	0,0±0,00
10N	6,2±2,08	4,1±0,23	2,8±0,41	2,8±0,41	1,6±2,21
AK+1T	39,5±0,74	14,8±3,03	4,5±3,41	3,4±1,77	2,6±0,69
AK+5T	47,7±5,40	37,8±6,91	20,7±4,05	9,3±1,47	6,4±0,32
AK+10T	47,3±1,86	28,6±4,07	10,1±0,89	4,9±1,17	3,1±0,61
AK+1N	48,0±1,95	24,0±0,02	6,1±1,07	1,7±1,47	0,3±0,48
AK+5N	44,9±4,24	23,8±0,77	4,8±0,14	1,7±0,44	0,0±0,00
AK+10N	54,6±1,10	23,4±0,40	3,6±0,33	0,0±0,00	0,0±0,00
1T+1N	43,8±2,78	14,4±1,91	6,7±0,69	3,8±0,38	3,5±0,89
1T+5N	39,3±3,03	18,6±2,02	11,1±2,53	11,1±2,53	10,4±3,54
1T+10N	32,7±0,31	17,0±1,13	12,6±0,36	10,5±1,34	8,8±1,84
5T+1N	32,2±4,84	5,8±2,42	3,4±0,97	2,7±0,00	0,7±0,97
5T+5N	35,2±1,29	14,0±0,84	10,2±2,46	8,7±2,49	7,6±0,91
5T+10N	31,0±2,62	15,5±1,31	12,1±0,37	9,3±2,35	7,9±0,41
10T+1N	36,1±0,51	11,4±4,04	8,2±4,55	3,9±0,51	3,6±0,00
10T+5N	35,2±0,16	11,5±2,50	3,7±0,04	3,7±0,04	3,3±0,56
10T+10N	30,7±1,72	14,8±0,41	12,3±0,99	11,7±1,96	10,9±0,93

<sup>1</sup>Ortalama ± standart sapma

<sup>2</sup>Aynı sütun veya satırda bulunan iki ortalama arasındaki farklılık 2,22 kritik değerinden büyük ise ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır (p<0,05)

AK: Asit kazein

1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

Bekletme süresinin 30 dakikaya ulaşmasıyla birlikte en yüksek stabilite 5T (%37,8) ve AK+5T (%37,8) örneklerinde gözlenmiş ancak 10T (%37,3) örneği ile bu iki örnek arasında önemli bir farklılık oluşmamıştır (p>0,05). Bu dönemde en düşük stabilite değerine 1N (%3,4) ve 5N (%3,4), örnekleri sahip olurken bu iki örnek ile 10N (%4,1) örneği arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05). Bekletme süresi 60 dakikaya ulaştığında en düşük stabilite değerine %1,4 ile 5N örneği sahip olmuş, ancak bu örneğin stabilite değeri ile 1N (%1,6), 10N (%2,8), 5T+1N (%3,4) ve AK+10N (%3,6) örneklerinin stabilite değerleri benzer bulunmuştur (p>0,05). Bu dönemde en yüksek stabilite değeri %36,0 ile 10T örneğine ait olmuştur. Bu örnek diğer bütün örneklerden istatistiksel olarak

da farklı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 10T örneğini %33,2 ve %31,2 değerleri ile sırasıyla 5T ve 1T örnekleri takip etmiştir.

Bekletmenin 90. dakikasında stabilite değerleri 60. dakikadaki stabilite değerlerine benzer bir durum ortaya koymuş olup bu dönemde de en yüksek değere %33,4 değeri ile 10T örneği sahip olmuştur. Ancak bu örnek ile 5T (%32,6) örneği arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). 120 dakikalık süre sonunda örneklerin köpük stabiliteleri çok küçük değerlere hatta bazı örneklerde sıfır düzeyine inmiştir. Bu dönemde 1T (%29,9), 5T (%32,6) ve 10T (%33,4) örnekleri diğer örneklerden daha yüksek stabiliteye sahip olarak istatistiksel açıdan da önemli düzeylere ulaşan bir ayrışma ortaya koymuştur ( $p < 0,05$ ). Neutrase ile hidrolizasyondan farklı bir şekilde tripsin ile hidroliz düzeyi %10'a ulaşmasına rağmen köpük stabilitesi artış göstermiştir. Bu sonuç, hidroliz derecesi arttıkça köpük stabilitesinin azaldığını saptayan Flanagan ve FitzGerald (2002), Van der Ven vd. (2002) ve Pralea vd. (2011)'nin sonuçlarının tam tersidir. Hidrolizasyon düzeyi arttıkça köpük stabilitesinin azalmasının nedeni olarak, hidroliz sonucu oluşan peptitlerin hava kabarcığı etrafındaki proteinlerin yerine geçmesi veya hava kabarcığındaki protein-protein etkileşimini azaltması ve hidroliz sonrası artan yük yoğunluğu gösterilebilir.

Kazeinatların genellikle yüksek köpük hacmi oluşturdukları ancak yumurta akı ve peyniraltı suyu konsantresinden daha düşük köpük stabilitesi sağladıkları belirtilmiştir (Mulvihill, 1992). Genel olarak kazeinatların düşük köpük stabilitesine sahip olması AK örneğinin köpük stabilitesinin düşük çıkmasını desteklemektedir.

Protamex enzimi ile %13,3 düzeyinde hidrolize edilen kazeinin incelenen bütün pH değerlerinde herhangi bir köpük stabilitesi göstermediği saptanmıştır (Flanagan ve FitzGerald, 2002). Bu durumun, dayanıklı köpük oluşumunu sağlayan amfifilik özelliğin kaybına yol açan kısa zincirli peptitlerden kaynaklandığı belirtilmiştir.

Sodyum kazeinatı 11 farklı ticari enzim (Pem, Flavourzyme, Alcalase, Promod 184, Promod 258, Pepsin, Protex 6L, NewlaseF, Corolase PP, Corolase L10 ve Validase FP) ile hidrolize eden Van der Ven vd. (2002), kazein hidrolizatlarının (hidrolizasyon derecesi %0,5-22,0) çoğunluğunda köpük stabilitesini sodyum kazeinata göre daha düşük bulmuşlardır. Kazein hidrolizatlarının köpük stabilitesinin moleküler ağırlık dağılımına

paralellik gösterdiğini, 7 kDa'dan büyük peptitlerin fazla bulunmasının köpük stabilitesini arttırdığını saptamışlardır. Köpük stabilitesindeki bu değişkenliğin, kullanılan enzimlerin özgünlüklerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. Bu verilerden, köpük oluşumunda amfifilik peptitlerin bulunması en önemli faktör iken köpük stabilitesinde ise en önemli faktörün belirli molekül ağırlığındaki peptitlerin bulunması olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Pralea vd. (2011), sodyum kazeinatı kimotripsin ile farklı düzeylerde hidroliz edip (maksimum hidroliz derecesi %8,7) santrifüj işlemi sonrası sıvı fazı (pH 4,6'da çökmeyen kısım) donuk kuruttuktan sonra işlevsel özelliklerini incelemişlerdir. Hidrolize olmamış kazein örneği hidrolizatlara oranla daha yüksek bir köpük stabilitesi göstermiş, hidroliz süresi arttıkça köpük stabilitesinin azaldığı saptanmıştır. Bu veriler, köpük kapasitesini arttırmak için sınırlı bir hidrolizin gerekli olduğunu, ancak böyle bir durumda köpük stabilitesinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir.

Protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimini çalışmamızdakine benzer bir şekilde inceleyen herhangi bir kaynağa rastlanmadığından protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin köpük stabilitesini literatür verileriyle doğrudan karşılaştırmak mümkün olamamıştır.

#### **4.4.6 Emülsiyon aktivite indeksi**

Proteinler taşıdıkları hidrofobik ve hidrofilik gruplar nedeniyle emülsiyon oluşturabilirler. Bir gram protein tarafından stabilize edilen  $m^2$  olarak ara-yüzey alanını ifade eden emülsiyon aktivite indeksi değerlerine atı bulgular Çizelge 4.6 ve Şekil 4.4'te sunulmuştur.

**Çizelge 4.6.** Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının emülsiyon aktivite indeksleri

Örnek	Emülsiyon Aktivite İndeksi (m <sup>2</sup> /g) <sup>1</sup>
AK	182,2±3,09 <sup>ik</sup>
1T	205,5±18,65 <sup>klm</sup>
5T	194,6±14,97 <sup>kl</sup>
10T	236,2±22,24 <sup>n</sup>
1N	157,4±5,08 <sup>fghi</sup>
5N	123,7±0,44 <sup>bcde</sup>
10N	76,2±1,27 <sup>a</sup>
AK+1T	163,3±9,50 <sup>ghi</sup>
AK+5T	198,5±1,88 <sup>klm</sup>
AK+10T	195,6±1,27 <sup>kl</sup>
AK+1N	210,3±33,69 <sup>lm</sup>
AK+5N	224,7±14,71 <sup>mn</sup>
AK+10N	208,4±3,06 <sup>klm</sup>
1T+1N	139,7±2,23 <sup>defg</sup>
1T+5N	136,0±0,70 <sup>cdef</sup>
1T+10N	114,7±8,80 <sup>bcd</sup>
5T+1N	145,3±5,65 <sup>efgh</sup>
5T+5N	122,1±0,61 <sup>bcde</sup>
5T+10N	109,8±12,61 <sup>bc</sup>
10T+1N	170,1±8,25 <sup>hi</sup>
10T+5N	130,0±2,06 <sup>bcde</sup>
10T+10N	105,6±6,65 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Ortalama ± standart sapma

a, b, c...: Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır (p<0,05)

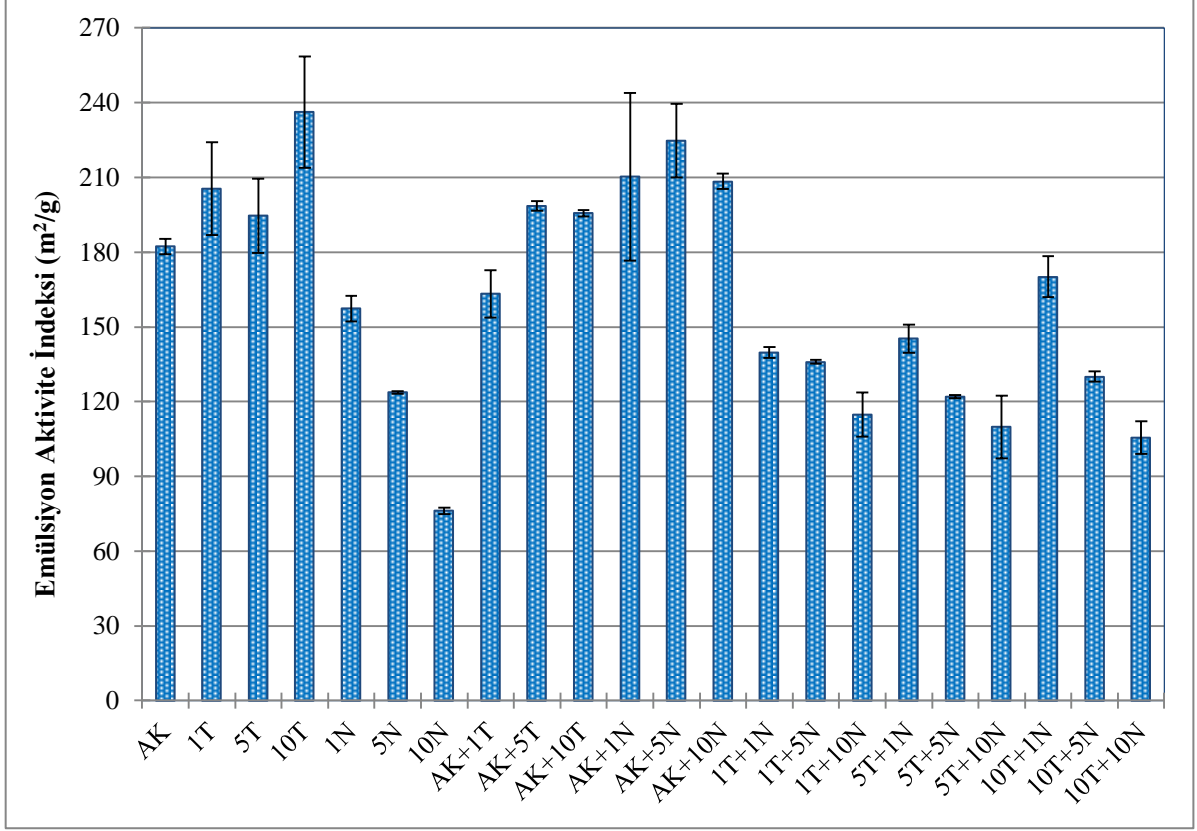
AK: Asit kazein

1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

Deneme örneklerine ait pH 7,0'daki emülsiyon aktivite indeksi değerleri arasında herhangi bir farklılık bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla yapılan varyans analizi sonucunda örneklerin emülsiyon aktivite indeksi değerleri arasındaki farklılığın çok önemli düzeyde olduğu saptanmıştır (p<0,001). En yüksek emülsiyon aktivite indeksi 236,2 m<sup>2</sup>/g ile 10T örneğinde tespit edilmiş olmakla birlikte bu örnek istatistiksel olarak AK+5N (224,7 m<sup>2</sup>/g) örneği ile benzerlik göstermektedir (p>0,05). En düşük emülsiyon aktivite indeksi değerine ise 76,2 m<sup>2</sup>/g değeri ile 10N örneği sahip olmuştur. Bu örnek, diğer örneklerin tamamından

istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük emülsiyon aktivite indeksi değeri göstermiştir ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.4.** Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının emülsiyon aktivite indeksleri (AK: Asit kazein; 1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri; 1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri)

Tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizasyon sonrasında elde edilen 1T (205,5 m<sup>2</sup>/g), 5T (194,6 m<sup>2</sup>/g) ve 10T (236,2 m<sup>2</sup>/g) örneklerinin tamamı başlangıç maddesi olan AK (182,2 m<sup>2</sup>/g) örneğine göre daha yüksek bir emülsiyon aktivite indeksi değeri göstermiştir. Tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidroliz işleminin 10T örneği hariç istatistiksel olarak önemli olmasa da emülsiyon aktivite indeksi değerini arttırdığı saptanmıştır. Neutrase enzimi ile hidrolizasyon, tripsine oranla tam tersi bir sonuç elde edilmesine yol açmıştır. Neutrase enzimi ile hidrolizasyon düzeyinin artmasına paralel olarak emülsiyon aktivite indeksi değerleri düşüş göstermiştir. Bu grup içerisinde en yüksek emülsiyon aktivite indeksi değeri 157,4 m<sup>2</sup>/g ile 1N örneğine ait iken, 5N örneği 123,7 m<sup>2</sup>/g ve 10N örneği ise 76,2

$m^2/g$  emülsiyon aktivite indeksi değerine sahip olmuştur. Bu üç örnek arasındaki farklılık istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tripsin ve Neutrased enzimlerinin peptit bağını parçalama özgünlüklerinin farklı olmasının bu sonuçta etkili olduğu düşünülmektedir.

Şekil 4.4'ten de görüldüğü üzere tripsin enzimi ile farklı düzeylerde hidroliz sonucunda üretilmiş kazein hidrolizatlarının AK ile etkileşimi (protein-peptit) sonucunda hazırlanan örneklerin (AK+1T, AK+5T ve AK+10T) emülsiyon aktivite indeksleri  $163,3 m^2/g$ ,  $198,5 m^2/g$  ve  $195,6 m^2/g$  şeklinde hidroliz düzeyine bağlı olarak düzensiz bir değişim göstermiştir. Protein-peptit etkileşim sonucu hazırlanan AK+10T ( $195,6 m^2/g$ ) örneğinin emülsiyon aktivite indeksi, AK ( $182,2 m^2/g$ ) ve 10T ( $236,2 m^2/g$ ) örneklerinin emülsiyon aktivite indeksleri arasında yer alırken, AK+1T ( $163,3 m^2/g$ ) örneği kendi bileşenlerinden (AK  $182,2 m^2/g$  ve 1T  $205,5 m^2/g$ ) daha düşük, AK+5T. ( $198,5 m^2/g$ ) örneği de kendi bileşenlerinden (AK  $182,2 m^2/g$  ve 5T  $194,6 m^2/g$ ) daha yüksek emülsiyon aktivite indeksine sahip olmuştur. Bu durum, hidrolizatlardaki peptit boyutu ve protein-peptit etkileşiminin emülsiyon aktivite indeksi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Neutrased enzimi ile farklı düzeylerde hidroliz sonucunda üretilmiş kazein hidrolizatlarının AK ile etkileşimi (protein-peptit) sonucunda hazırlanan örneklerin (AK+1N, AK+5N ve AK+10N) emülsiyon aktivite indeksleri  $210,3 m^2/g$ ,  $224,7 m^2/g$  ve  $208,4 m^2/g$  şeklinde düzensiz bir değişim göstermiştir ( $p>0,05$ ). Protein-peptit etkileşimi sonucu hazırlanan örneklerin tamamının emülsiyon aktivite indeksleri, kendilerini hazırlamak için kullanılan AK ( $182,2 m^2/g$ ), 1N ( $157,4 m^2/g$ ), 5N ( $123,7 m^2/g$ ) ve 10N ( $76,2 m^2/g$ ) örneklerinin emülsiyon aktivite indekslerinden büyük çıkmıştır. Ayrıca istatistiksel açıdan da AK+10N örneği hariç önemli bir farklılık bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bu durum Neutrased hidrolizi sonucunda elde edilen peptitlerin AK ile emülsiyon aktivite indeksini arttıracak şekilde etkileşime girdiğini göstermektedir.

Peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin (1T+1N, 1T+5N, 1T+10N, 5T+1N, 5T+5N, 5T+10N, 10T+1N, 10T+5N ve 10T+10N) emülsiyon aktivite indeksleri hidroliz düzeyinden bağımsız bir değişim göstermiş ve genellikle kendilerini üretmek için

kullanılan bileşenlerden daha düşük emülsiyon aktivite indeksi değerlerine sahip olmuştur. Bu durum, peptit boyutu ve peptit-peptit etkileşiminin emülsiyon aktivite indeksinde önemli parametreler olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Chobert vd. (1988a), kazeini tripsin ile %4,3, 8,0 ve 9,9 düzeyinde hidrolize ettiklerinde hidrolize edilmemiş kazeine göre emülsiyon aktivite indeksinde 6-8 pH aralığında iyileşme sağlandığını belirlemişlerdir. Ancak V8 proteazı ile %2,0 ve 6,7 düzeyinde hidrolize edilen örneklerin emülsiyon aktivite indeksinde iyileşme olmadığı saptanmamıştır. Bu sonuçlar, hidrolizasyonda kullanılan enzimin özgünlüğünün hidrolizatın emülsiyon oluşturma özelliğini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

Haque ve Mozaffar (1992) asit kazeinin immobilize tripsin enzimiyle hidrolize edip emülsiyon aktivite indeksini belirlemişlerdir. Asit kazeinin 144 m<sup>2</sup>/g olan emülsiyon aktivite indeksinin, tripsin ile %2, 3, 4 ve 5 düzeyinde hidroliz sonrasında sırasıyla 225, 340, 362 ve 298 m<sup>2</sup>/g değerlerine yükseldiğini saptamışlardır.

Crowley vd. (2002) tarafından Neutrase, Protamex, Alcalase, Flavourzyme ve PTN 3.0S ticari enzimleriyle sodyum kazeinatın %1 düzeyinde hidrolize edildiği çalışmada, kendi çalışmamızda Neutrase enzimiyle elde edilen sonuçlara benzer şekilde, bütün hidrolizat örneklerinin pH 4,0-8,0'da hidrolize edilmemiş sodyum kazeinata oranla hafifçe daha düşük emülsiyon aktivitesi sergilediği saptanmıştır.

Çalışmamıza benzer şekilde, Luo vd. (2014) sodyum kazeinatın emülsiyon aktivite indeksini 175,64 m<sup>2</sup>/g olarak belirlemişlerdir. Tripsin enzimiyle hidrolizasyon düzeyi %14,9'dan %20,7'ye yükseldikçe emülsiyon aktivite indeksinin de arttığını saptamışlardır. Düzenli olmamasına karşın çalışmamızda da tripsin hidrolizi ile elde edilen örneklerde benzer bir artış gözlenmiştir.

Protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimini çalışmamızdakine benzer bir şekilde inceleyen herhangi bir kaynağa rastlanmadığından protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin emülsiyon aktivite indeksini literatür verileriyle doğrudan karşılaştırmak mümkün olamamıştır.

#### 4.4.7 Emülsiyon stabilite indeksi

Yüzeyde krema tabakası oluşumu ve emülsiyon damlacıklarının kümeleşmesi sonucunda emülsiyonun bozulması gerçekleşmektedir. Emülsiyon damlacıklarının kümeleşmesi damlacık boyutunu arttırmakta ve sonuçta da genellikle krema tabakası oluşumuna yol açmaktadır. Emülsiyon oluşturma işleminin etkin yapılmaması durumunda da kısa sürede krema tabakasının oluşumu gözlenebilir. Deneme örneklerinin pH 7,0'da oluşturdukları emülsiyonun dayanım süresinin (dakika olarak) bir ölçüsü olan emülsiyon stabilite indeksi değerlerine ait veriler Çizelge 4.7 ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Örneklerin emülsiyon stabilite indeksi değerleri arasında herhangi bir farklılık bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla yapılan varyans analizi sonucunda örneklerin emülsiyon stabilite indeksi değerleri arasındaki farklılığın önemli düzeyde olduğu saptanmıştır ( $p<0,02$ ).

En yüksek emülsiyon stabilite indeksi 91,9 dk ile 10T örneğinde tespit edilmiş olmakla birlikte bu örnek istatistiksel olarak 1T (74,1 dk), 1T+1N (64,1 dk) ve 5T+10N (64,6 dk) örnekleri ile benzerlik göstermektedir ( $p>0,05$ ). En düşük emülsiyon stabilite indeksi değerine ise 29,5 dk ile AK+5T ve AK+1N örnekleri sahip olmuştur. Bu örneklerin düşük emülsiyon stabilite indeksi göstermelerinin nedeni amfifilik peptitlerin yeterli düzeyde bulunmaması veya amfifilik peptitlerin kendi aralarındaki etkileşimi sonucunda amfifilik karakterin azalması olabilir (Nielsen, 1997).

Tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizasyon sonrasında elde edilen 1T (74,1 dk), 5T (59,3 dk) ve 10T (91,9 dk) örneklerinin tamamı başlangıç maddesi olan AK (34,4 dk) örneğine göre daha yüksek bir emülsiyon stabilite indeksi göstermiştir. Tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidroliz işleminin 1T ve 10T örneklerinin emülsiyon stabilite indeksi değerini AK örneğine kıyasla istatistiksel olarak önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır ( $p<0,05$ ).

**Çizelge 4.7.** Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının emülsiyon stabilite indeksleri

Örnek	Emülsiyon Stabilite İndeksi (dk) <sup>1</sup>
AK	34,4±7,94 <sup>ab</sup>
1T	74,1±24,53 <sup>cd</sup>
5T	59,3±13,75 <sup>abc</sup>
10T	91,9±14,12 <sup>d</sup>
1N	41,4±9,08 <sup>ab</sup>
5N	44,7±15,64 <sup>abc</sup>
10N	48,6±9,93 <sup>abc</sup>
AK+1T	49,9±22,70 <sup>abc</sup>
AK+5T	29,5±7,56 <sup>a</sup>
AK+10T	36,9±7,15 <sup>ab</sup>
AK+1N	29,5±6,85 <sup>a</sup>
AK+5N	43,1±0,41 <sup>ab</sup>
AK+10N	38,0±5,30 <sup>b</sup>
1T+1N	64,1±12,31 <sup>bcd</sup>
1T+5N	51,4±9,81 <sup>abc</sup>
1T+10N	54,1±0,72 <sup>abc</sup>
5T+1N	53,8±23,66 <sup>abc</sup>
5T+5N	52,4±3,22 <sup>abc</sup>
5T+10N	64,6±17,80 <sup>bcd</sup>
10T+1N	63,0±4,51 <sup>bc</sup>
10T+5N	50,4±2,25 <sup>abc</sup>
10T+10N	48,7±11,76 <sup>abc</sup>

<sup>1</sup>Ortalama ± standart sapma

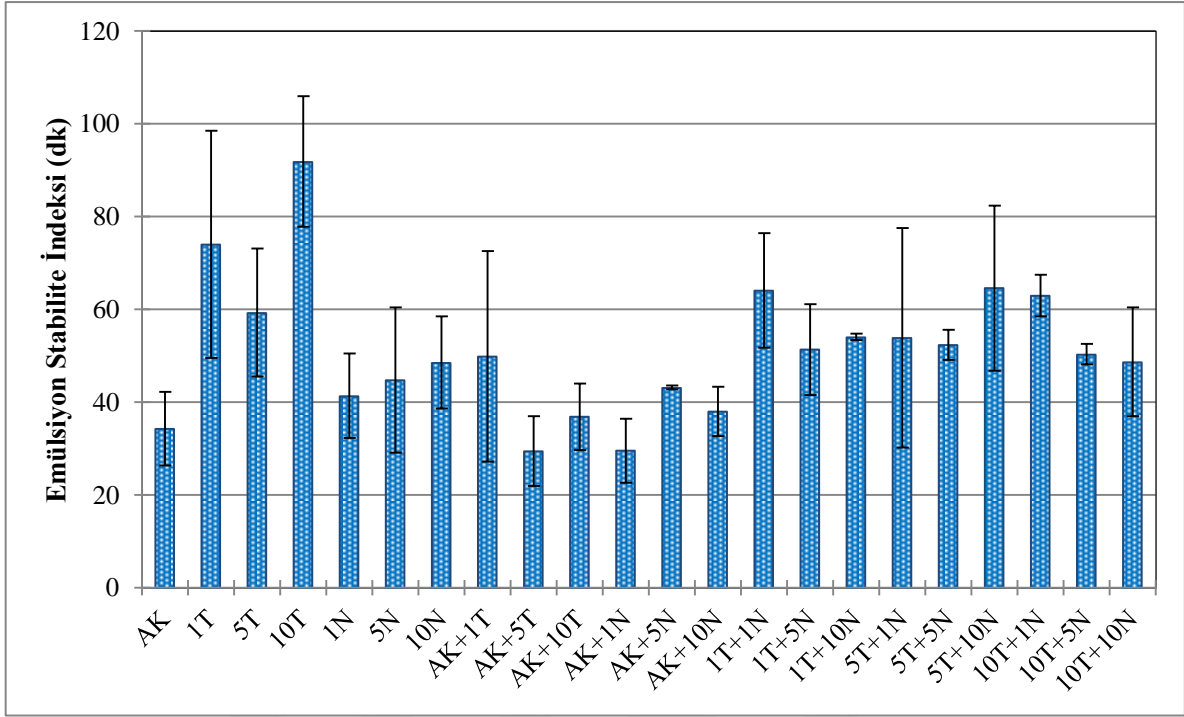
a, b, c, d: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan farklıdır (p<0,05)

AK: Asit kazein

1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri

Neutrase enzimi ile hidrolizasyon, tripsin enzimi ile hidrolizasyona benzer bir sonuç elde edilmesini sağlamıştır. Neutrase enzimi ile hidrolizasyon düzeyinin artmasına paralel olarak emülsiyon stabilite indeksi değerleri de artış göstermiştir. İstatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunmamakla birlikte (p>0,05) bu grup içerisinde en yüksek emülsiyon stabilite indeksi değeri 48,6 dk ile 10N örneğine ait iken, 5N örneği 44,7 dk ve 1N örneği ise 41,4 dk emülsiyon stabilite indeksi değerine sahip olmuştur.



**Şekil 4.5.** Asit kazein, hidrolizat ve karışımlarının emülsiyon stabilite indeksleri (AK: Asit kazein; 1T, 5T, 10T: Tripsin enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri; 1N, 5N, 10N: Neutrase enzimi ile %1, 5 ve 10 düzeyinde hidrolize edilen kazein örnekleri)

Tripsin enzimi ile farklı düzeylerde hidroliz sonucunda üretilmiş kazein hidrolizatlarının AK ile etkileşimi (protein-peptit) sonucunda hazırlanan örneklerin (AK+1T, AK+5T ve AK+10T) emülsiyon stabilite indeksleri 49,9 dk, 29,5 dk ve 36,9 dk şeklinde hidroliz düzeyine bağlı olarak düzensiz bir değişim göstermiştir. Protein-peptit etkileşimi sonucu hazırlanan AK+1T (49,9 dk) ve AK+10T örneklerinin emülsiyon stabilite indeksleri, AK (34,4 dk) ve 1T (74,1 dk) veya 10T (91,9 dk) örneklerinin emülsiyon stabilite indeksleri arasında yer alırken, AK+5T (29,5 dk) örneği kendi bileşenlerinden (AK 34,4 dk ve 5T 59,3 dk) daha düşük emülsiyon stabilite indeksine sahip olmuştur. Bu durum hidrolizatlardaki peptit boyutunun ve protein-peptit etkileşiminin emülsiyon stabilite indeksi üzerinde etkiye sahip önemli bir parametre olduğunu göstermektedir.

Neutrase enzimi ile farklı düzeylerde hidroliz sonucunda üretilmiş kazein hidrolizatlarının AK ile etkileşimi (protein-peptit) sonucunda hazırlanan örneklerin (AK+1N, AK+5N ve AK+10N) emülsiyon stabilite indeksleri 29,5 dk, 43,1 dk ve 38,0 dk şeklinde düzensiz bir değişim

göstermiştir. Protein-peptit etkileşimi sonucu hazırlanan AK+1N (29,5 dk) örneği kendi bileşenleri olan AK (34,4 dk) ve 1N (41,4 dk) örneklerinden daha düşük, AK+5N (43,1 dk) ve AK+10N (38,0 dk) örnekleri ise kendi bileşenleri olan AK (34,4 dk), 5N (44,7 dk) veya 10N (48,6 dk) örnekleri arasında bir emülsiyon stabilite indeksi değeri göstermiştir. Bu durum Neutrase hidrolizi sonucunda elde edilen peptitlerin AK ile emülsiyon stabilite indeksini azaltacak şekilde etkileşime girebileceğini göstermektedir.

Peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin (1T+1N, 1T+5N, 1T+10N, 5T+1N, 5T+5N, 5T+10N, 10T+1N, 10T+5N ve 10T+10N) emülsiyon stabilite indeksleri hidroliz düzeyinden bağımsız bir değişim göstermiştir. Etkileşim sonucu hazırlanan örnekler istisnalar olmakla birlikte çoğunlukla kendilerini üretmek için kullanılan tripsin hidrolizatlarından daha düşük, ancak Neutrase hidrolizatlarından ise daha yüksek bir emülsiyon stabilite indeksi değerine sahip olmuştur. Bu durum, peptit boyutu ve peptit-peptit etkileşiminin emülsiyon stabilite indeksinde önemli parametreler olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Crowley vd. (2002) tarafından Neutrase, Protamex, Alcalase, Flavourzyme ve PTN 3.0S ticari enzimleriyle sodyum kazeinatın %1 düzeyinde hidrolize edildiği çalışmada, bizim çalışmamızdaki sonuçların tersine, bütün hidrolizat örneklerinin pH 6,0-8,0'da hidrolize edilmemiş sodyum kazeinata oranla daha düşük emülsiyon stabilitesi sergilediği saptanmıştır.

Çalışmamıza benzer şekilde, Luo vd. (2014) sodyum kazeinatın emülsiyon stabilite indeksini 33,79 dk olarak belirlemişlerdir. Tripsin enzimiyle hidrolizasyon düzeyi %14,9'dan %20,7'ye yükseldikçe emülsiyon stabilite indeksinin (43,91-74,00 dk arasında) düzensiz bir artış gösterdiğini, ancak sodyum kazeinattan daha yüksek bir değere sahip olduğunu saptamışlardır. Düzenli olmasa da çalışmamızda da benzer bir artış gözlenmiş, ancak çalışmamızda daha yüksek stabilite indeksi değerine (91,9 dk) ulaşılmıştır.

Protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimini çalışmamızdakine benzer bir şekilde inceleyen herhangi bir kaynağa rastlanmadığından protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin emülsiyon stabilite indeksini literatür verileriyle karşılaştırmak mümkün olamamıştır.

## BÖLÜM V

### SONUÇLAR

Tripsin ve Neutrase enzimleri kullanılarak asit kazein, hidroliz derecesi %1, 5 ve 10 olacak şekilde hidrolize edilmiş ve sonra da protein-peptit ve peptit-peptit etkileşimi gerçekleştirilmiştir.

Asit kazein ve hidrolize kazein örneklerinin (1T, 5T, 10T, 1N, 5N ve 10N) su, kül ve protein içeriklerinin sırasıyla %1,87-4,78, %1,54-5,41 ve %92,62-97,29 arasında değişim gösterdiği saptanmıştır.

Tripsin enzimine oranla Neutrase enziminin daha küçük peptitlerin oluşumunu sağladığı trisin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile tespit edilmiştir.

Hidrolizatlar (1T, 5T, 10T, 1N, 5N ve 10N), protein-peptit (AK+1T, AK+5T, AK+10T, AK+1N, AK+5N ve AK+10N) ve peptit-peptit (1T+1N, 1T+5N, 1T+10N, 5T+1N, 5T+5N, 5T+10N, 10T+1N, 10T+5N, 10T+10N) etkileşimi ile hazırlanan örnekler, bütün pH değerlerinde (1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 ve 11,0), istisnalar olmakla birlikte asit kazeine oranla daha yüksek bir protein çözünürlüğü göstermiştir. Asit kazeine göre 3,0 pH değerlerinde AK+10T ve AK+1N örneklerinin daha düşük bir protein çözünürlüğüne sahip olmaları, çözünürlük üzerine protein-peptit etkileşiminin önemli etkisinin olduğunu göstermiştir.

Asit kazein örneğinin su tutma kapasitesi  $3,01 \pm 0,199$  g su/g örnek olarak saptanmıştır. Asit kazein dışında kalan örneklerin analiz koşullarında çözünmesi nedeniyle, bunlara ait su tutma kapasitelerinin doğru bir şekilde ölçülmesi mümkün olamamıştır.

Deneme örneklerinin yağ tutma kapasitesi 0,74-2,32 g yağ/g örnek arasında değişim göstermiştir. Genel olarak her iki enzim ile hidroliz sonucunda elde edilen örneklerin (1T, 5T, 10T, 1N, 5N ve 10N) yağ tutma kapasitelerinde kazeine göre iyileşme sağlanmıştır. Özellikle, en yüksek yağ tutma kapasitesini AK+1N örneğinin göstermesi dikkat çekici bulunmuştur. Bu durum, 5N, 10N ve özellikle de 1N örneği içerisinde bulunan peptitlerin

AK ile yağ tutma kapasitesini arttıracak yönde etkileşime girdiğini göstermektedir. Bu sonuç, peptit boyutu ve protein-peptit etkileşiminin yağ tutma kapasitesinde önemli olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Tripsin ve Neutrased enzimleri ile hidrolize edilen örneklerin köpük kapasiteleri asit kazeine göre daha düşük bulunmuştur. Gerek tripsin ve Neutrased enzimi yardımıyla üretilen hidrolizatlar ile asit kazein arasındaki etkileşim (protein-peptit etkileşimi) gerekse hidrolizatların kendi aralarındaki etkileşim (peptit-peptit etkileşimi) sonucu hazırlanan örneklerin köpük kapasiteleri, asit kazeinin köpük kapasitesinden daha düşük çıkmıştır. Bu durum, tripsin veya Neutrased enzimi ile hidroliz sonucunda elde edilen peptitlerin kendi aralarında veya asit kazein ile köpük kapasitesini azaltacak şekilde etkileşime girdiğini göstermiştir.

Deneme örneklerinin köpük stabilitesi bekletme süresine bağlı olarak bütün örneklerde önemli düzeyde azalma göstermiştir. 10 dakikalık bekletme süresi sonunda ilginç bir şekilde en yüksek köpük stabilitesine %54,6 ile AK+10N örneği sahip olmuştur. Bu dönemde 10N (%6,2) örneği gibi AK (%23,9) örneği de düşük bir köpük stabilitesi değeri göstermiştir. Düşük köpük stabilitesine sahip bu iki örneğin etkileşimi ile hazırlanan AK+10N örneğinin daha yüksek stabilize göstermesi protein-peptit etkileşiminin stabilizeye olumlu katkı sağladığını ortaya koymuştur.

Tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizasyon sonrasında elde edilen örneklerin tamamı asit kazein örneğine göre daha yüksek bir emülsiyon aktivite indeksi değeri göstermiştir. Neutrased enzimi ile hidrolizasyon, tripsine oranla tam tersi bir sonuç elde edilmesine yol açmıştır. Neutrased enzimi ile hidrolizasyon düzeyinin artmasına paralel olarak emülsiyon aktivite indeksi değerleri düşüş göstermiştir. Elde edilen bu sonuçta, tripsin ve Neutrased enzimlerinin peptit bağını parçalama özgünlüklerinin farklı olmasının etkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca hidrolizatlardaki peptit boyutu ve protein-peptit etkileşiminin emülsiyon aktivite indeksi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu da belirlenmiştir.

Peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin emülsiyon aktivite indeksleri hidroliz düzeyinden bağımsız bir değişim göstermiş ve genellikle kendilerini üretmek için

kullanılan bileşenlerden daha düşük emülsiyon aktivite indeksi değerlerine sahip olmuştur. Bu durum, peptit boyutu ve peptit-peptit etkileşiminin emülsiyon aktivite indeksinde önemli parametreler olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Gerek Neutrase ve gerekse tripsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizasyonda hidrolizasyon derecesinin artmasına paralel olarak emülsiyon stabilite indeksi de artış göstermiştir. Tripsin ve Neutrase enzimleriyle farklı düzeylerde hidroliz sonucunda üretilmiş kazein hidrolizatlarının asit kazein ile etkileşimi (protein-peptit) sonucunda hazırlanan örnekler ile peptit-peptit etkileşiminin incelendiği örneklerin emülsiyon stabilite indeksleri düzensiz bir değişim göstermiştir.

Genel olarak tripsin ve Neutrase enzimlerinin özgünlüklerinin farklı olması değişik kimyasal ve işlevsel özelliklere sahip hidrolizatlara ve bunların etkileşimlerine yol açmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler protein-peptit ve peptit-peptit etkileşiminin işlevsel özellikler üzerinde çok etkili olabileceğini ortaya koymuştur. İleriki çalışmalarda işlevsel özellikler üzerinde etkili olan hidrolizatlardaki peptitlerin ve etkileşim şekillerinin belirlenmesinin hem uygulama hem de bilgi birikimi açısından yararlı olacağı değerlendirilmektedir.

## KAYNAKLAR

Abd El-Salam, M.H. and El-Shibiny. S. "Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(6), 1119-1132, 2017.

Adler-Nissen, J., "Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid", *J. Agric. Food Chem.* 27(6), 1979.

Adler-Nissen, J., "Enzymic Hydrolysis of Food Proteins", *Elsevier Applied Science Publishers* 132–142, 1986.

Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W. and Rao, R. M., "Solubilized wheat protein isolate: Functional properties and potential food applications", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1340–1345, 1999.

Amiot, J., Germain, L., Turgeon, S., Lemay, M., Ory-Salam, C. and Auger, F. A., "Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture", *Int. Dairy J.* 14, 619–626, 2004.

Anonim, "Official methods of analysis of AOAC International", (*16<sup>th</sup>. Ed.*), *Association of Official Analytical Chemists International* Arlington, VA. USA, 1997.

Banach, J.C., Lin, Z. and Lamsal, B.P., "Enzymatic modification of milk protein concentrate and characterization of resulting functional properties", *LWT - Food Science and Technology* 54, 397-403, 2013.

Barbut, S., "Determining water and fat holding In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality*", *Blackie Academic and Professional* 186–225, 1999.

Beuchat, L.R., Cherry, J.P. and Quinn, M.R., "Physicochemical properties of peanut flour as affected by proteolysis", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23, 616-620, 1975.

Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B. and Mercier, J.C. "Premiers elements de structure primaire des caseines  $\alpha_{s2}$  bovines", *FEBS Lett.* 71, 111–116, 1976.

Broyard, C., and Gaucheron, F., "Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge", *Dairy science & Technology* 95(6), 831-862, 2015.

Byler, D.M., Farrell, H.M., Jr. and Susi, H., "Raman spectroscopic study of casein structure", *J. Dairy Sci.* 71, 2622–2629, 1988.

Caessens, P.W.J.R., Daamen, W.F., Gruppen, H., Visser, S., and Voragen, A.G.J., "Beta-Lactoglobulin Hydrolysis. 2. Peptide Identification, SH/SS Exchange, and Functional Properties of Hydrolysate Fractions Formed by the Action of Plasmin", *J. Agric. Food Chem.* 47, 2980–2990. 1999.

Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Samperi, R. and Lagana, A., "Recent trends in the analysis of bioactive peptides in milk and dairy products", *Anal Bioanal Chem.* 408, 2677–2685, 2016.

Chandi, G.K., and Sogi, D.S. "Functional properties of rice bran protein concentrates", *Journal of Food Engineering* 79, 2592-597, 2007.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L. and Lorient, D., "Amino acids, peptides and proteins. Ch. 5 in Food Chemistry O.R. Fennema (Ed.)", *Marcel Dekker Inc.*, New York, 24, 63-69, 1985.

Chobert, J.M., Bertrand-Hand, C. and Nicolas, M.G., "Solubility and Emulsifying Properties of Caseins and Whey Proteins Modified Enzymatically by Trypsin", *J. Agric. Food Chem.* 36, 883-892, 1988a.

Chobert, J.M., Bertrand-Hand, C. and Nicolas, M.G., "Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by Staphylococcus aureus V8 protease", *J. Agric. Food Chem.* 36, 883-892, 1988b.

Creamer, L.K., Richardson, T. and Parry, D.A.D., "Secondary structure of bovine  $\alpha_{s1}$  - and  $\beta$ -casein in solution", *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 689–696, 1981.

Creusot, N. and Gruppen, H., "Hydrolysis of whey protein isolate with *Bacillus licheniformis* protease: aggregating capacities of peptide fractions" *J. Agric. Food Chem.* 56 (21), 10332–10339, 2008.

Creusot, N., Gruppen, H., Van Koningsveld, G. A., de Kruif, C. G. and Voragen, A. G. J., "Peptide–peptide and protein–peptide interactions in mixtures of whey protein isolate and whey protein isolate hydrolysates", *Int. Dairy J.* 16, 840–849, 2006.

Crowley, P., O'Brien, C.M.O., Slattery, H., Chapman, D., Arendt, E.K. and Stanton, C., "Functional properties of casein hydrolysates in bakery applications", *Eur. Food Res Technol.* 215, 131–137, 2002.

Damodaran, S., "Interfaces, protein films and foams" In J. E. Kinsella (Ed.), *Advances in food and nutrition research*, Vol. 34, 61, *Academic Press Inc.* San Diego, 1990.

Darewicz, M., Dziuba, J. and Dziuba M., "Functional Properties and Biological Activities of Bovine Casein Proteins and Peptides", *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 15, 79–86, 2006.

De Kruif, C.G. and Holt, C., "Casein micelle structure, functions, and interactions, in, *Advanced Dairy Chemistry Proteins*", 3rd edn., Vol. 1A, P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, eds., *Kluwer Academic/Plenum Publishers* New York, 233–270, 2003.

Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, H.M., Jr., Harwalkar, V.R., Jenness, R. and Whitney, R.McL., "Nomenclature of proteins of cow's milk 5th revision", *J. Dairy Sci.* 67, 1559–1631, 1984.

El-Bakry, M., "Functional and Physicochemical Properties Of Casein And Its Use In Food And Non-Food Industrial Applications", *Chemical Physics Research Journal*, 4, 2012.

Farrell, H.M. Jr., Malin, E.L., Brown, E.M. and MoraGutierrez, A., "Review of the chemistry of  $\alpha$ s<sub>2</sub> casein and the generation of a homologous molecular model to explain its properties", *J. Dairy Sci.* 92, 1338–1353, 2009.

Farrell, H.M., Jr., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F. and Swaisgood, H.E.,

“Nomenclature of the proteins of cows’ milk: sixth revision”, *J. Dairy Sci.* 87,1641–1674, 2004.

Flanagan, J. and FitzGerald, R.J., “Functionality of Bacillus proteinase hydrolysates of sodium caseinate”, *International Dairy Journal* 12,737–74, 2002.

Fox, P.F. and Kelly, A. L., "The caseins. In R. Y. Yada (Ed.), Proteins in food processing", Cambridge, UK, *Woodhead Publishing Limited* 29-71, 2004.

Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H., “Advanced Dairy Chemistry Volume 1A, Proteins: Basic Aspects”, 4th Edition, *Springer*, New York, 2013.

Fox, P.F., “Milk proteins as food ingredient”, *International Journal of Dairy Technology* 54(2), 2001.

Frister, H., Meisel, H. and Schlimme, E., “OPA method modified by use of N,N-dimethyl-2-mercaptoethylammonium chloride as thiol component”, *Fresenius Z Anal Chem.* 330, 631-633, 1988.

Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J. and Parmentier, M., “Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by product hydrolysates”, *Journal of Food Science* 69, 615–622, 2004.

Groleau, P.E., Morin, P., S.F., Gauthier, and Pouliot, Y., “Effect of Physicochemical Conditions on Peptide–Peptide Interactions in a Tryptic Hydrolysate of  $\beta$ -Lactoglobulin and Identification of Aggregating Peptides”, *J. Agric. Food Chem.* 51, 4370–4375, 2003.

Guan, X., Yao, H., Chen, Z., Shan, L. and Zhang, M., “Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin”, *Food Chemistry* 101, 163– 170, 2007.

Hambraeus, L. “Nutritional aspects of milk proteins”, In Advanced Dairy Chemistry- Vol 1: Proteins; Fox, P.F., Ed., *Elsevier Science Publishers* Essex, 457-490, 1992.

Haque, Z.U. and Mozaffar, Z., “Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides”, *Food hydrocolloids* 5, 559-571, 1992.

Herskovits, T.T., “On the conformation of casein. ORD properties”, *Biochem.* 5, 1018–1026, 1966.

Holland, J.W., Deeth, H.C. and Alewood, P.F., “Resolution and characterization of multiple isoforms of bovine  $\kappa$ -casein by 2-DE followed by reversible cysteine-tagging enrichment strategy”, *Proteomics* 6, 3087–3095, 2006.

Kaur, M. and Singh, N., “Characterization of Protein Isolates from Different Indian Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars”, *Food Chemistry* 2007.

Kinsella, J.E., “Functional Properties of Proteins in Foods”, *Food Science and Nutrition* 9, 219-280, 1979.

Kinsella, J.E., “Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams”, *Food Chemistry* 7, 273-288, 1981.

Kosters, H.A., Wierenga, P.A., de Vries, R. and Gruppen, H., “Characteristics and effects of specific peptides on heat-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin”, *Biomacromolecules* 12, 2159–2170, 2011.

Kosters, H.A., Wierenga, P.A., de Vries, R. and Gruppen, H., “Protein–peptide interaction: Study of heat-induced aggregation and gelation of  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of two peptides from its own hydrolysate”, *J. Agric. Food Chem.* 61, 4218–4225, 2013.

Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A., “Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40, 43–81, 2000.

Lorient, D., Closs, B. and Courthaudon, J. L., “Surface properties of the bovine casein components: relationships between structure and foaming properties”, *J. Dairy Res.* 56, 495-502, 1989.

Luo, Y., Pan, K. and Zhong, Q., “Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: partial characterizations”, *Food chemistry* 155,146-154, 2014.

- Mahmoud, M.I., Malone W.T. and Cordle C.T., "Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties", *J Food Sci.* 57, 1223–1229, 1992.
- Makri, E., Papalamprou, E. and Doxastakis, G., "Study of functional properties of seed storage proteins from Indigenous european legume Crops (Lupine, Pea, Broad Bean) in admixture with polysaccharides", *Food Hydrocolloids* 19, 583594, 2005.
- Malin, E.L., Brown, E.M., Wickham, E.D. and Farrell, H.M., Jr., "Contributions of terminal peptides to the associative behavior of  $\alpha_{s1}$ -casein", *J. Dairy Sci.* 88, 2318–2328, 2005.
- Mercier, J.C., "Phosphorylation of the caseins, present evidence for an amino acid triplet code posttranslationally recognized by specific kinases", *Biochimie.* 63, 1–17, 1981.
- Mercier, J.C., Grosclaude, F. and Ribadeau-Dumas, B., "Structure primaire de la casine  $\alpha_{S1}$ -bovine", *Eur. J. Biochem.* 23, 41-51, 1971.
- Minkiewicz, P., Slangen, C.J., Lagerwerf, F.M., Haverkamp, J., Rollema, H.S. and Visser, S., "Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of bovine  $\kappa$ -casein macropeptide and characterization of isolated fractions", *J. Chrom.* A743, 123–135, 1996.
- Moure, A., Sineiro, J. and Dominguez, H., "Extraction and functionality of membrane concentrated protein from defatted Rosa rubiginosa seeds", *Food Chemistry* 74, 327-339, 2001.
- Mulvihill, D.M., "Production, functional properties and utilization of milk protein products", In Advanced Dairy Chemistry- Vol 1: Proteins, Fox, P.F., Ed., *Elsevier Science Publishers Essex*, 369-404, 1992.
- Naczki, M., Diosady, L.L. and Rubin, L.J., "Functional properties of canola meals produced by a two-phase solvent extraction system", *Journal of Food Science* 50, 1685-1692, 1985.
- Nielsen, P.M., "Functionality of Protein Hydrolysates", In: Damodaran, S. and Paraf, A., eds. Food Proteins and Their Applications, *Marcel Dekker*, New York, 443-472, 1997.

Noelken, M. and Reibstein, M., "Conformation of  $\beta$ -casein B" *Archives of Biochemistry and Biophysics* 123, 397-402,1968.

Ogunwolu, S.O., Henshaw, F.O., Mock, H.P., Santos, A. and Awonorin, S.O., "Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut", *Food Chemistry* 115, 852–858, 2009.

Panyam, D. and Kilara, A., "Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification", *Trends. Food Sci Technol.* 7, 120–125, 1996.

Pearce, K.N. and Kinsella, J.E., "Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 716723, 1978.

Pralea, D., Dumitrascu, L., Borda, D. and Stănciuc, N., "Functional properties of sodium caseinate hydrolysates as affected by the extent of chymotrypsinolysis", *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 17(3), 308-314, 2011.

Saldamlı, İ. ve Temiz, A., "Aminoasitler, Peptitler ve Proteinler", Gıda kimyası, *Hacettepe Üniversitesi Yayınları* Ankara, 195-257, 1998.

Schägger, H., "Tricine–SDS–PAGE", *Nature Protocols* 1, 16-22, 2006.

Seena, S. and Sridhar, K. R., Physiochemical, functional and cooking properties of Canavalia", *Journal of Food Chemistry* 32, 406–412, 2005.

Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S.N. and Bawa, A.S., "Functional and edible uses of soy protein products", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7, 14-28, 2008.

Slattery, H. and FitzGerald, R.J., "Functional Properties and Bitterness of Sodium Caseinate Hydrolysates Prepared with a Bacillus Proteinase", *J Food Sci.* 63, 418–422, 1998.

Subagio, A., "Characterization of Hyacinth Bean (*lablab purpureus* L. Sweet) Seeds from Indonesia and Their Protein Isolate", *Food Chemistry* 95, 65-70, 2006.

- Swaisgood, H.E. "Chemistry of the caseins", In *Advanced Dairy Chemistry- Vol 1: Proteins*; Fox, P.F., Ed., *Elsevier Science Publishers Essex*, 63-110, 1992.
- Talbo, G.H., Suckau, D., Malkoski, M. and Reynolds, E.C, "MALDI-PSD-MS analysis of the phosphorylation sites of caseinomacropeptide", *Peptides* 22 , 1093–1098, 2001.
- Trieu-Cuot, P. and Gripon J.C., "Electrofocusing and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins", *J. Dairy Res*, 48 , 303–310, 1981.
- Uluko, H., Liu, L., Lv, J. and Zhang, S., "Functional characteristics of milk protein concentrates and their modification", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(7), 1193-1208, 2016.
- Van der Ven, C., Gruppen, H., Dries B. A. de Bont and Voragen, A. G. J., "Emulsion Properties of Casein and Whey Protein Hydrolysates and the Relation with Other Hydrolysate Characteristics", *J. Agric. Food Chem.* 49, 5005–501, 2001.
- Van der Ven, C., Gruppen, H., De Bont, D. B. A. and Voragen, A. G. J., "Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and -stabilizing ability of whey and casein hydrolysates", *J. Agric. Food Chem.* 50, 2938-2946, 2002.
- Van der Ven., C., "Biochemical and functional characterisation of casein and whey protein hydrolysates", *Ph.D. thesis Wageningen University* The Netherlands, 2002.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J. and Millán, F., "Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties", *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77, 447–450, 2000.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. "Dairy technology: principles of milk properties and processes", *Marcel Dekker* New York, 1999.
- Wang, J.C. and Kinsella, J.E., "Functional Properties of Novel Proteins: Alfalfa Leaf Protein", *Journal of Food Science* 41, 1976.
- Wilde, P. J., and Clark, D. C., "Foam formation and stability. In *Methods in Testing Protein Functionality*", Hall, G. M., Ed., *Blackie Academic and Professional* London, U.K., pp 110-152, 1996.

Yang, M., Shi, Y. and Liang, Q., “Effect of microbial transglutaminase crosslinking on the functional properties of yak caseins: a comparison with cow caseins”, *Dairy science & technology* 96.1: 39-51, 2016.

Zayas, J.F., “Functionality of Proteins in Food”, *Springer-Verlag, Berlin*, 1996.

Zhu, H. and Damodaran, S. “Protease peptones and physical factors affect foaming properties of whey protein isolate”, *J. Food Sci.* 59, 554-560, 1994.



## ÖZGEÇMİŞ

Leyla Ömeroğlu 13.01.1993 tarihinde Alanya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğretimini Alanya'da tamamladı. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne başlayıp Haziran 2015'de mezun oldu. 2015-2016 yılları arasında Aksu Meyve Suyu Tic. A.Ş'nde Gıda Mühendisi olarak çalıştı. 2015'te Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2016-2017 yılları arasında Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde proje asistanlığı yaptı.



